

50376
1987
175

50376
1987
175

N° d'ordre : 143

T H E S E

présentée

à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN BIOLOGIE

ET PHYSIOLOGIE VEGETALE

par

ALBERTO RAMIREZ LOPEZ



**MISE EN EVIDENCE D'UNE ATTAQUE MICROBIENNE
DE DERIVES DE LIGNINE EN ANAEROBIOSE**

Présentée le 06 Juillet 1987 devant la Commission d'Examen

Président : J. GUILLAUME
Rapporteurs : G. ALBAGNAC
C. ROMOND
Examineurs : M. BARRELLE
F. TAILLIEZ
J.P. TOUZEL

SCD LILLE 1



D 030 322180 8

50376
1987
175

50376
1987
175



Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur Jean-Pierre TOUZEL à la Station de Technologie Alimentaire (Directeur : Monsieur Guy ALBAGNAC) de l'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE.

Ce travail a été partiellement soutenu par une bourse du Conseil National de Science et Technologie (CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA, CONACYT) du Mexique et par le Comité d'Etudes sur les Formations d'Ingénieurs (C.E.F.I.) dans le cadre du VIII^{ème} Programme C.E.F.I.-CONACYT.

Exemplaire corrigé après avis du jury

RESUME

Nous avons essayé de démontrer la dégradabilité microbienne de lignines de type industriel (lignine KRAFT et lignine à la soude de paille de blé et de sciure de peuplier, Induline AT Westvaco) en anaérobiose par une culture mixte provenant d'un digesteur anaérobie traitant des contenus de panse de ruminants.

Un temps d'incubation prolongé s'est avéré nécessaire pour la mise en évidence de modifications dans la structure des lignines par spectrophotométrie U.V., chromatographie sur gel, C.H.L.P. et R.M.N. Toutefois une adaptation des microorganismes à l'utilisation des lignines comme seule source de carbone a été démontrée par le développement des bactéries dans un milieu minéral vitaminé tamponné par l'HEPES. Les résidus oligosaccharidiques liés à la lignine semblaient favoriser la dégradation des lignines.

Des facteurs tels que la solubilité des lignines, le pH, ainsi que la procédure d'extraction et la concentration dans le milieu de culture, provoquaient des variations dans la phase d'adaptation et dans le degré d'attaque bactérienne des structures polyphénoliques. Ces observations nous ont amené à conclure que la lignine KRAFT de paille était celle qui se dégradait le plus.

Des concentrations de lignine allant jusqu'à 6 g.l^{-1} dans un milieu minéral vitaminé non tamponné étaient capables de soutenir une croissance microbienne. Ces cultures provoquaient des modifications structurales mises en évidence par spectrographie R.M. N.

SUMMARY

We have tried to demonstrate the microbial degradation of industrial-type lignins (KRAFT and soda lignins from wheat straw and poplar sawdust, as well as Westvaco's Indulin AT) under anaerobic conditions by a mixed culture obtained from an anaerobic digester fed with rumen contents.

Long incubation periods were necessary to observe some structure modifications on the lignins, using U.V. spectrophotometry, gel permeation chromatography, H.P.L.C. and N.M.R. However, microbial adaptation to lignins as sole carbon source was observed in a vitamin mineral medium buffered with HEPES. Carbohydrate residues chemically attached to the lignins seemed to favor lignin degradation.

Other factors like solubility, pH, extraction procedure and lignin concentration in the culture medium affected the lag phase as well as the extent of bacterial attack on the polyphenolic structures. From these observations we concluded that KRAFT lignin was most easily degraded than the others.

Concentrations of lignins up to 6 g.l^{-1} in an unbuffered vitaminated mineral medium were supporting some microbial growth. Structural modifications of lignins were noticed on the N.M.R. spectra.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur J. GUILLAUME,

Je tiens à vous montrer ma reconnaissance pour avoir accepté de présider mon jury.

A Monsieur G. ALBAGNAC, Directeur de Recherche à l'I.N.R.A.

Pour m'avoir accueilli à la Station de Technologie Alimentaire en me donnant l'occasion de travailler dans une ambiance scientifique de haut niveau et pour votre appui dans mes initiatives, je me permets de vous exprimer ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur C. ROMOND,

Votre participation comme membre du jury ainsi qu'en tant que rapporteur m'a permis de faire votre connaissance et en même temps de profiter de votre compétence dans le domaine de la microbiologie. Je vous en remercie.

A Monsieur le Professeur M. BARRELLE,

Veuillez trouver ici mes plus sincères remerciements pour votre collaboration dans ce travail ainsi que pour votre participation comme membre de ce jury.

A Monsieur le Professeur F. TAILLIEZ,

Je vous remercie pour votre collaboration concernant les démarches administratives auprès de l'Université, ainsi que pour votre participation dans ce jury.

A Monsieur J.-P. TOUZEL, Chargé de Recherche à l'I.N.R.A.

Je ne trouve pas de qualificatifs suffisamment forts pour te faire part de ma reconnaissance pour ton dévouement, ta disponibilité et ton enthousiasme tout au long de mon travail, qui d'ailleurs, n'aurait pas été réalisé sans ta collaboration. Tes qualités humaines et scientifiques ont été pour moi inestimables.

Pendant ces trois années passées à la Station de Technologie Alimentaire de l'I.N.R.A., j'ai eu l'occasion de discuter de mon travail avec les chercheurs : Messieurs *H.-C. DUBOURGUIER, D. VERRIER, E. SAMAIN et J.-L. ROUSTAN* ; je tiens à les remercier.

Je tiens à remercier particulièrement *Monsieur J.P. LEPOUTRE* pour m'avoir appris les secrets de la chromatographie liquide haute performance ainsi que de l'analyse automatique des sucres.

A toutes ces personnes qui, à différents moments de mon stage, m'ont aidé dans la réalisation de ce travail : *F. FONTAINE, M. KUBACZKA, M. LOONIS, C. VASSEUR, J.F. MIGDAL et J. JACQUEMONT*, je dois aussi ma gratitude.

A *P. PELLERIN, B. GRUSON, I. THOMAS, P. DELPLANQUE, F. FREGARD* qui ont fait de mon stage dans ce laboratoire une expérience humaine enrichissante, GRACIAS AMIGOS.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

=====

	Page

<u>IMPORTANCE DE LA LIGNINE</u>	1
<u>LOCALISATION ET FONCTION</u>	3
<u>STRUCTURE ET SYNTHÈSE DES LIGNINES</u>	4
<u>PROPRIÉTÉS PHYSIQUES</u>	13
<u>PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES</u>	13
<u>PROCÉDURES D'EXTRACTION ET D'ISOLEMENT DES LIGNINES</u>	14
<u>LA BIODEGRADATION DES LIGNINES ET DE LEURS DÉRIVÉS</u>	21
A - La dégradation des lignines en aérobiose	21
I - Champignons capables d'utiliser la lignine	21
II - Actinomycètes utilisateurs de lignine	23
III - Dégradation de lignine par des levures	25
IV - Dégradation aérobie de lignine par des bactéries.	25
B - La biodégradation des lignines en anaérobiose	28
I - Le métabolisme des composés aromatiques en anaérobiose	28
II - La dégradation anaérobie des polymères de lignine	54
1) Biodégradation anaérobie de lignine dans des environnements naturels	54
2) Dégradation de lignine dans le rumen	59
3) Dépolymérisation anaérobie des oligolignols	61
<u>CONCLUSIONS DE L'ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL</u>	63

MATÉRIELS ET MÉTHODES

=====

<u>DESCRIPTION DES MATIÈRES PREMIÈRES</u>	66
<u>MÉTHODES D'EXTRACTION DE LA LIGNINE</u>	67
A.- Extraction à la liqueur KRAFT	67
B.- Extraction à la soude à chaud	67
C.- Extraction au dioxane	68
<u>MÉTHODES D'ANALYSE</u>	69
A.- Matière sèche	69
B.- Minéraux	69
C.- Protéines (azote Kjeldahl)	69
D.- Fibre détergent neutre	69
E.- Fibre détergent acide	69
F.- Lignine	69

<u>PURIFICATION DES LIGNINES</u>	71
<u>TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES</u>	71
A.- Composition du milieu de culture	71
B.- Suivi des cultures	71
I.- Dosage des acides gras volatils	74
II.- Analyse des gaz de fermentation	74
III.- Analyses des composés phénoliques par CLHP	77
IV.- Dosage des sucres totaux	78
V.- Chromatographie de perméation sur gel	78
VI.- Observations au microscope	79
VII.- Analyse par RMN	79
PARTIE EXPERIMENTALE	
=====	
<u>ANALYSE DES MATIERES PREMIERES ET OBTENTION DES LIGNINES</u>	80
<u>SCHEMA GENERAL DES EXPERIENCES REALISEES</u>	83
A.- Résumé des différentes étapes de culture microbienne	83
B.- Suivi des cultures	88
<u>ESSAIS D'ADAPTATION : ETAPE I</u>	90
<u>CULTURES D'ENRICHISSEMENT : ETAPE II</u>	94
A.- Analyses des échantillons brut	94
B.- Analyses des fractions	99
<u>EFFETS DES CONDITIONS MICRO-AEROPHILES ET DE LA CONCENTRATION EN LIGNINE : ETAPE III</u>	108
<u>CULTURES DANS UN MILIEU MINERAL : ETAPE IV</u>	116
<u>DEGRADATION DES LIGNINES PURIFIEES : ETAPE V</u>	123
<u>CULTURES DE TRANSITION : ETAPE VI</u>	135
<u>CULTURES D'ENRICHISSEMENT : ETAPE VII</u>	138
<u>COMPARAISON ENTRE LES ETAPES IV A VII</u>	141
<u>ESSAIS DE DEGRADATION DANS UN MILIEU NON TAMPONNE : ETAPE VIII</u>	144
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	166
=====	
BIBLIOGRAPHIE	170
=====	

FIGURES

N°	Titre	Page
1	Structure des monomères de la lignine	4
2	Biosynthèse de la lignine	5
3a	Formation des radicaux libres pendant la synthèse de la lignine	6
3b	Mécanisme de polymérisation "queue-à-queue" (end-wise)	6
4	Types de dilignols et oligolignols présents dans la structure de la lignine	8
5	Structure théorique de la lignine proposée par NIMZ (1974)	11
6a	Structure proposée pour les lignosulfonates	13
6b	Structure proposée pour la lignine KRAFT	13
7	Photométabolisme anaérobie de l'acide benzoïque proposée par EVANS (1977)	30
8	Mécanisme de réduction du phénol en anaérobiose (EVANS, 1977)	30
9	Voie métabolique proposée pour l'oxydation anaérobie du p-crésol en p-hydroxybenzoate dans des conditions dénitrifiantes	31
10	Voie métabolique anaérobie pour la méthanisation du benzoate	33
11	Voies métaboliques proposées pour la transformation de l'acide benzoïque	34
12	Biodégradation anaérobie de l'hydroquinone et du catéchol (SZEWZYK et SCHINK, 1985)	38
13	Voies métaboliques proposées pour la dégradation anaérobie de l'acide syringique (KAISER et HANSELMANN, 1982)	42
14a	Minéralisation de composés aromatiques substitués	44
14b	Transformation des aromatiques substitués en catéchol	44
15	Transformation des composés phénoliques hydroxylés en anaérobiose (SAMAIN, communication personnelle)	45
16	Voies de dégradation proposées pour les composés aromatiques (HEALY et YOUNG, 1980)	46
17	Voies métaboliques proposées pour la méthanisation du férulate (GRBIC- GALIC et YOUNG, 1985)	47
18	Transformation des composés aromatiques dans le rumen	49
19	Composés intermédiaires de la dégradation anaérobie des dérivés de lignine (GRBIC-GALIC, 1985)	50
20	Voies métaboliques proposées pour la méthanisation des composés phénoliques substitués (YOUNG et RIVERA, 1985)	52
21	Interactions microbiennes pour la dégradation du chlorobenzoate (DOLFING et TIJEDJE, 1986)	53
22	Place de la lignine dans le cycle du carbone	56
23	Dégradation des oligolignols en anaérobiose (COLBERG et YOUNG, 1985b)	64
24	Dégradation de l'AGA en anaérobiose (CHEN et al., 1985)	64
25	Schéma de purification de la lignine selon LUNQUIST et KIRK (1977).....	72
26	Schéma de traitement des échantillons prélevés	
27	Schéma de fractionnement des échantillons liquides selon JOKELA et al. (1985)	75
		76
28	Bilan des matières pour les procédures d'extraction	82
29	Sélection des conditions de culture pour la mise en évidence de la biodégradation	84
30	Analyse par perméation sur gel des échantillons liquides de l'étape I	92
31	Spectres d'absorption U.V. des échantillons liquides non fractionnés de l'étape II	96
32	Chromatogrammes en perméation sur gel des échantillons liquides non fractionnés de l'étape II	97

33a - Spectres d'absorption U.V. de la fraction précipitée des échantillons liquides de l'étape II	101
33b - Spectres d'absorption U.V. de la fraction organo-soluble des échantillons liquides de l'étape II	102
34a - Analyse par chromatographie sur gel des fractions des échantillons liquides de l'étape II	103
34b - Analyse par chromatographie sur gel des fractions des témoins de l'étape II	104
35a - Analyse par CLHP des fractions des échantillons liquides de l'étape II	105
35b - Analyse par CLHP des fractions des échantillons liquides de l'étape II (suite)	106
36 - Cinétiques de production de méthane à l'étape III	109
37 - Cinétiques de production de méthane pour un milieu non réduit à l'étape III	109
38 - Spectres d'absorption U.V. des échantillons de l'étape III	113
39 - Analyse par chromatographie sur gel des échantillons de l'étape III	114
40 - Cinétiques de production de méthane à l'étape IV	117
41 - Spectres d'absorption U.V. des échantillons liquides de l'étape IV	120
42 - Chromatogrammes en perméation sur gel des échantillons liquides de l'étape IV	121
43 - Cinétiques de production de méthane pour la lignine KRAFT de paille à l'étape V	125
44 - Cinétiques de production de méthane pour l'Induline à l'étape V	125
45 - Spectres d'absorption U.V. des échantillons liquides de l'étape V	128
46a - Chromatogrammes de perméation sur gel des échantillons de l'étape V	129
46b - Chromatogrammes de perméation sur gel des échantillons de l'étape V (suite)	130
47a - Analyse par CLHP des échantillons liquides de l'étape V	131
47b - Analyse par CLHP des échantillons liquides de l'étape V (suite)	132
47c - Analyse par CLHP des échantillons liquides de l'étape V (fin)	133
48 - Cinétiques de production de méthane à l'étape VI	137
49 - Cinétiques de production de méthane à l'étape VII	137
50 - Protocole de fractionnement des échantillons pour l'analyse en RMN	145
51 - Cinétiques de production de méthane à l'étape VIII	148
52a - Analyse par CLHP des fractions de l'étape VIII	151
52b - Analyse par CLHP des fractions de l'étape VIII (suite)	152
53 - Spectre RMN de la lignine KRAFT de paille d'origine	157
54 - Agrandissement de la région des aromatiques du spectre RMN de la lignine KRAFT de paille d'origine	158
55 - Spectre RMN de la lignine KRAFT de paille incubée non inoculée	159
56 - Spectre RMN de la lignine KRAFT de paille après action microbienne	160
57 - Spectre RMN de l'Induline d'origine	161
58 - Agrandissement de la région des aromatiques du spectre RMN de l'Induline d'origine	162
59 - Spectre RMN de l'Induline après action microbienne	163
60 - Agrandissement de la région des aromatiques du spectre RMN de l'Induline après action microbienne	164

TABLEAUX

N°	Titre	Page
1	- Composés phénoliques susceptibles d'être dégradés en anaérobiose ...	40
2	- Composition du milieu de base BC	73
3	- Composition des matières premières avant et après l'extraction de la lignine	81
4	- Teneur des extraits en lignine (Klason) et en sucres totaux (anthrone)	81
6	- Evolution des paramètres de dégradation à l'étape I	91
7	- Solubilité des lignines dans le milieu de culture aux différents pH	93
8	- Variations de l'absorbance à 280 nm des différentes lignines au cours des essais de l'étape II	95
9	- Variations de l'absorbance à 280 nm des différentes fractions de lignines au cours des essais de l'étape II	100
10	- Evolution des sucres et des lignines au cours de l'étape III	112
11	- Evolution des paramètres de dégradation à l'étape IV	119
12a	- Evolution des paramètres de dégradation à l'étape V	126
12b	- Evolution des paramètres de dégradation à l'étape V	126
13	- Evolution des paramètres de dégradation à l'étape VI	136
14	- Evolution des paramètres de dégradation à l'étape VII	139
15	- Comparaison entre les différentes étapes IV à VII	142
16	- Evolution des paramètres de dégradation à l'étape VIII	146
17	- Fractionnement des échantillons pour la R.M.N.	149

ABREVIATIONS

AGA	Acide guaiacoxycétique
AGV	Acides gras volatils
BESA	Acide bromoéthane sulfonique
BC	Milieu de culture de base tamponné au carbonate/CO ₂
BCYT	Milieu BC supplémenté en extrait de levure et tryptone
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
DHP	Déhydroxypolymères de lignine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
GPC	Chromatographie de perméation sur gel
HEPES	Acide [(hydroxy-2-éthyl)-4-pipérazinyl-1]-2-éthanesulfonique
MO	Matière organique
MS	Matière sèche
MV	Matière volatile
RMN	Résonance magnétique nucléaire
TMS	Tétraméthylsilane
UV	Ultra violet
VGE	Vératrylglycérol- β -guaiacyl éther

INTRODUCTION

Après la cellulose, la lignine constitue le composé chimique naturel le plus abondant dans l'environnement. Cependant, la structure polymérisée hétérogène rend la lignine peu intéressante, voire nuisible, du point de vue industriel. La récalcitrance de la lignine qui permet aux plantes de résister aux maladies et aux altérations climatiques, fait en même temps que ce composé représente une pollution, comme par exemple dans les effluents de papeteries. D'autre part, considérée comme sous-produit, la lignine reste encore assez mal valorisée, malgré certaines utilisations telles que la combustion des liqueurs noires concentrées ou bien comme dispersant ou additifs [DUMON et GELUS, 1982 ; MULLER et GLASSER, 1983] ou encore dans une moindre mesure (lignine d'hydrolyse) pour améliorer la fluidité des suspensions de boues pendant les forages de puits de pétrole [NIKITIN, 1962].

Les déchets agricoles riches en cellulose ont été souvent utilisés pour l'alimentation animale, mais malgré leur teneur élevée en polysaccharides, ces matériaux présentent une digestibilité réduite due à la présence de lignine qui n'est pas assimilable par la flore du rumen [GOERING et VAN SOEST, 1970]. Des études expérimentales ont montré une corrélation élevée entre le contenu de lignine et la digestibilité *in vitro* ($R^2 \approx 0,91$) [REEVES, 1985], ce qui amène même à utiliser la lignine comme l'un des facteurs principaux dans la détermination de digestibilité *in vitro*.

L'intérêt porté au développement de la culture de la biomasse forestière a augmenté considérablement depuis quelques années. Un tel développement entraînerait aussi un accroissement considérable de la quantité de lignine disponible, jusqu'à 28 millions de tonnes par année en 1990, d'après les calculs de MULLER et GLASSER (1983). En conséquence, une meilleure connaissance des mécanismes de dégradation de la lignine s'avère nécessaire afin de pouvoir valoriser correctement le potentiel de ce polymère, et de

réduire en même temps le problème de manipulation des résidus que tout cela pourrait impliquer.

GENERALITES

LOCALISATION ET FONCTION

La lignine et les hémicelluloses remplissent les espaces existants entre les fibres de cellulose des tissus vasculaires végétaux. La lignine se localise essentiellement entre et à l'intérieur des parois primaires (lamella moyenne ou "middle lamella") des cellules vasculaires adjacentes. La concentration de lignine est plus faible dans la paroi des fibres que dans la lamella moyenne. Cependant, étant donné que cette paroi fibreuse occupe à peu près 90% du volume du tissu cellulaire, la majeure partie de la lignine se trouve donc dans cette partie des cellules [JANSHEKAR et FIECHTER, 1983].

Les fonctions principales de la lignine dans le métabolisme végétal peuvent être résumées de la façon suivante : la lignine sert comme adhésif et incrustant pour les constituants de la paroi cellulaire, elle donne rigidité à la paroi cellulaire, ce qui permet à la cellule de résister aux conditions externes (résistance aux stress mécaniques). La lignine diminue également la perméabilité à l'eau à travers les parois cellulaires dans les tissus du xylème, ce qui évite la perte d'eau des parois cellulaires. Cette caractéristique de la lignine joue aussi un rôle dans le transport d'eau et de nutriments et métabolites de la plante. La lignification est une réponse aux infections ou blessures [KUC et HAMMERSCHMIDT, 1982 ; GRISEBACH, 1981] qui résulte en une meilleure résistance au stress biochimique tel que l'attaque microbienne ou la blessure.

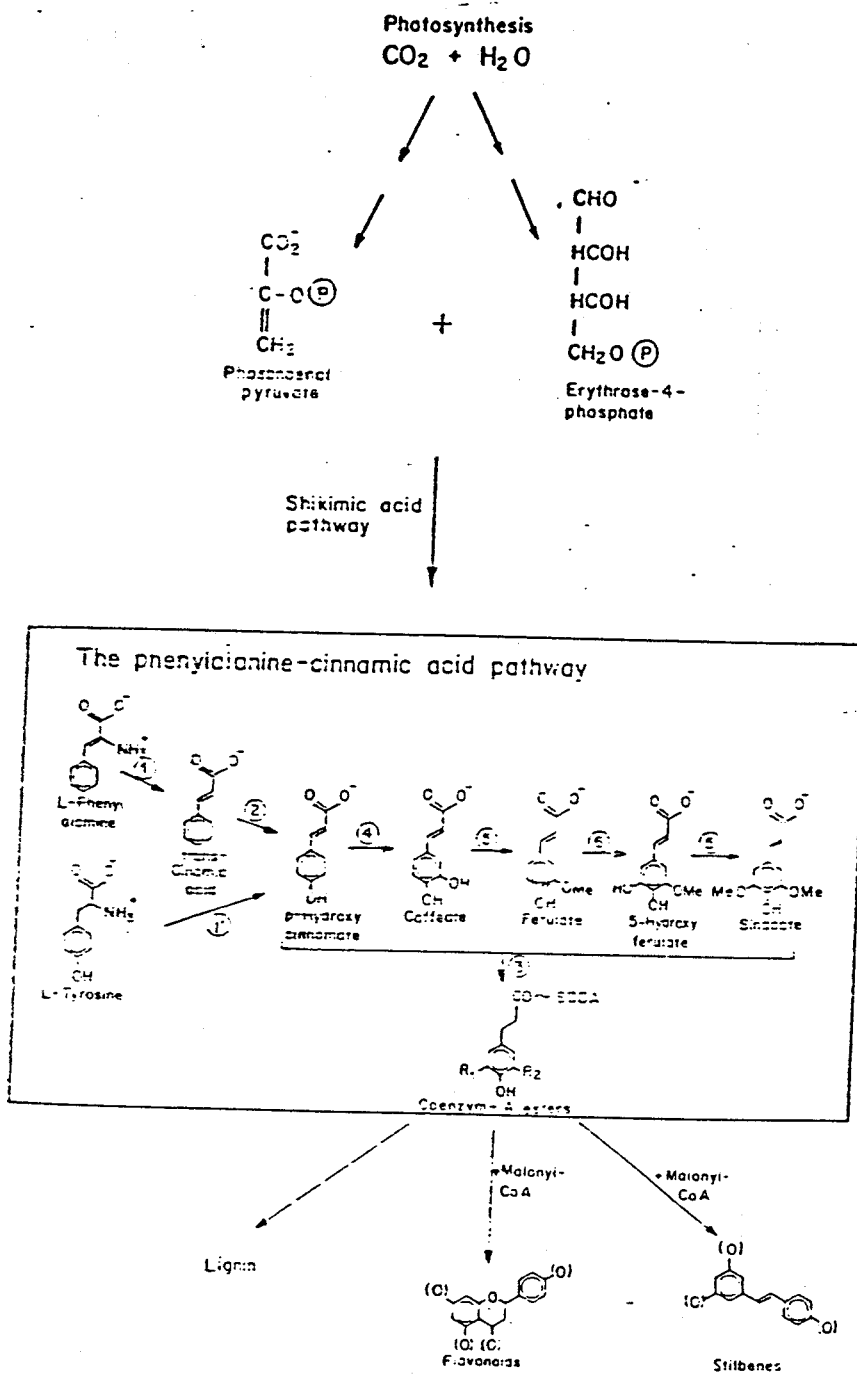


Fig. 2 : Biosynthèse de la lignine

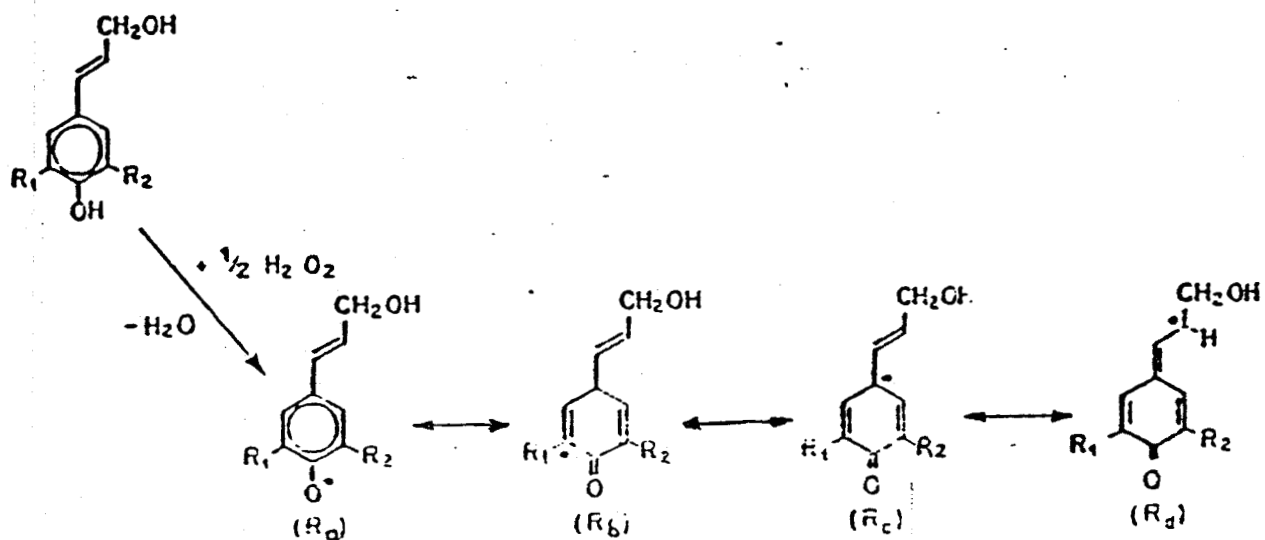


Fig. 3a : Formation des radicaux libres pendant la synthèse de la lignine

"End-wise" polymerization

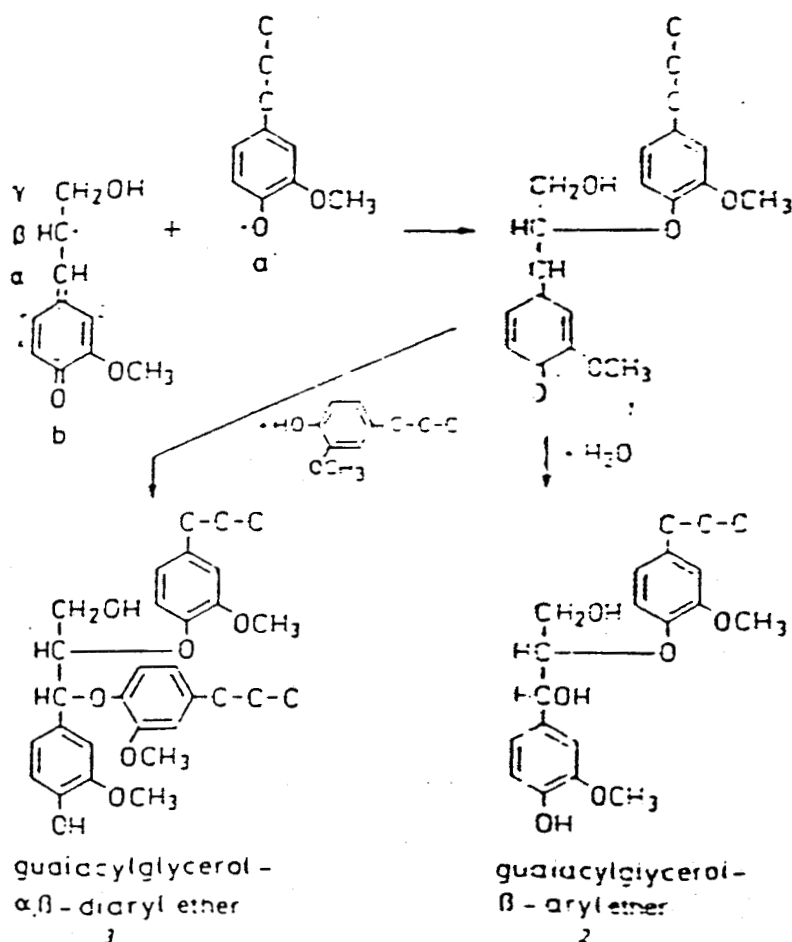


Fig. 3b : Mécanisme de polymérisation "queue-à-queue" (end-wise)

enzymatique. Ces réactions de couplage oxydatives dépendent essentiellement des potentiels d'oxydo-réduction des radicaux, des groupements fonctionnels et des conditions thermodynamiques pour chaque réaction [JANSHEKAR et FIECHTER, 1983 ; SCHAEFFER *et al.*, 1981].

Durant la synthèse de la lignine, il y a formation de nombreux modes de liaison inter-monomères, mais la liaison β -O-4 est la plus répandue dans la structure de la lignine (28 à 48% selon le type de lignine et son origine) [ADLER, 1977]. D'autre part, des liaisons C-C de type biphényle peuvent représenter jusqu'à 25% dans la structure des lignines, et des liaisons aryl-aryl éther jusqu'à 6%.

Le processus de polymérisation implique aussi des réactions entre les radicaux méthylène-quinone et des substances telles que des oses ou des acides phénoliques, ce qui expliquerait les liaisons observées entre la lignine et les hémicelluloses, ainsi que les liaisons avec des acides comme l'acide férulique et le p-coumarique, présents dans la paroi des cellules de plantes monocotylédones [SARKANEN, 1971]

Selon SARKANEN (1971), les lignines naturelles possèdent deux caractéristiques principales :

- elles sont synthétisées par polymérisation déshydrogénative des alcools p-coumarique, sinapique et/ou coniférilique
- et elles contiennent les types de liaisons inter-monomères représentées sur la Figure suivante (Fig. 4).

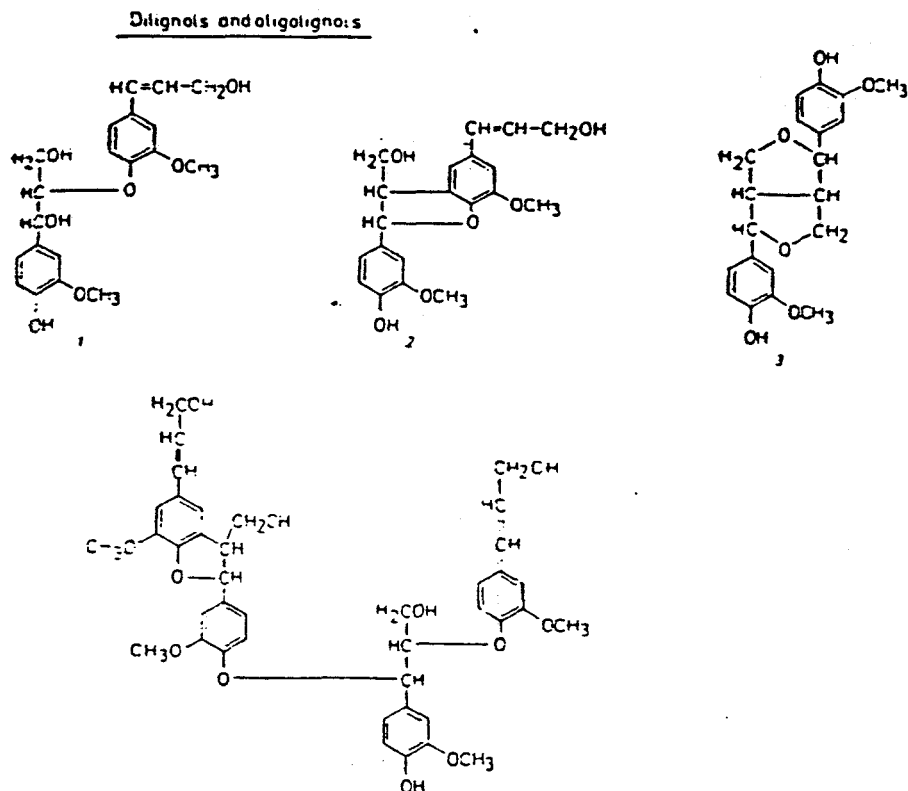


Fig. 4 : Types de liaisons inter-monomères présentes dans la lignine

Ces deux critères sont considérés comme indispensables pour la description et la définition de la structure de la lignine.

Par ailleurs, FREUDENBERG (1968) utilise d'autres critères pour établir sa définition de lignine : il considère que la formation de cétones de Hibbert et de p-hydroxybenzaldéhyde, vanilline et fréquemment de syringaldéhyde doivent aussi être compris dans le mécanisme de synthèse. Ainsi la formule élémentaire de la lignine devient $C_9H_{10}O_2 [H_2O]_n [OCH_3]_1$, où "n" ne doit pas excéder la valeur 1, alors que "1" doit se trouver entre 0 et 1,5. FREUDENBERG (1968) signale aussi que la lignine dans la plante doit être liée chimiquement aux polyosides et finalement elle doit être capable de réagir avec l'acide thioglycolique.

La polymérisation de la lignine est considérée par ZEIKUS (1981)

comme le facteur déterminant pour sa récalcitrance à la dégradation. Il signale que la lignine partage cette caractéristique avec des structures naturelles telles que la peau et les enveloppes tissulaires des plantes et des animaux.

STRUCTURE ET CLASSIFICATION DE LA LIGNINE

Le polymère résultant des réactions décrites auparavant est d'une grande complexité structurale, comme le montre la figure suivante (Fig. 5, page 11), proposée par NIMZ (1974).

De nature amorphe et non cristalline, la lignine ne montre pas une régularité structurale et sa composition en nombre et type de monomères diffère d'une espèce végétale à l'autre.

Cette variabilité a amené à établir une classification des différentes lignines existantes dans la nature. D'après GIBBS (1958), les lignines du royaume végétal peut être divisés en deux types principaux ou classes, à savoir:

a) Lignines guaiacyle.

Elles comprennent les lignines présentes dans la majorité des gymnospermes. Réaction négative au test de MAULE. Elles forment un groupe relativement uniforme de polymères naturels dont les différences principales sont dues à la variation dans le contenu d'unités de p-hydroxyphénylpropane. Quelques unes de ces lignines peuvent contenir en faibles quantités des unités de syringylpropane et des groupements ester.

b) Lignines guaiacyle-syringyle.

Lignines des angiospermes, y compris lignines d'herbes. Ces lignines produisent d'importantes quantités de syringaldehyde par oxydation au nitrobenzène. Réaction positive au test de MAULE. Ce type de lignines

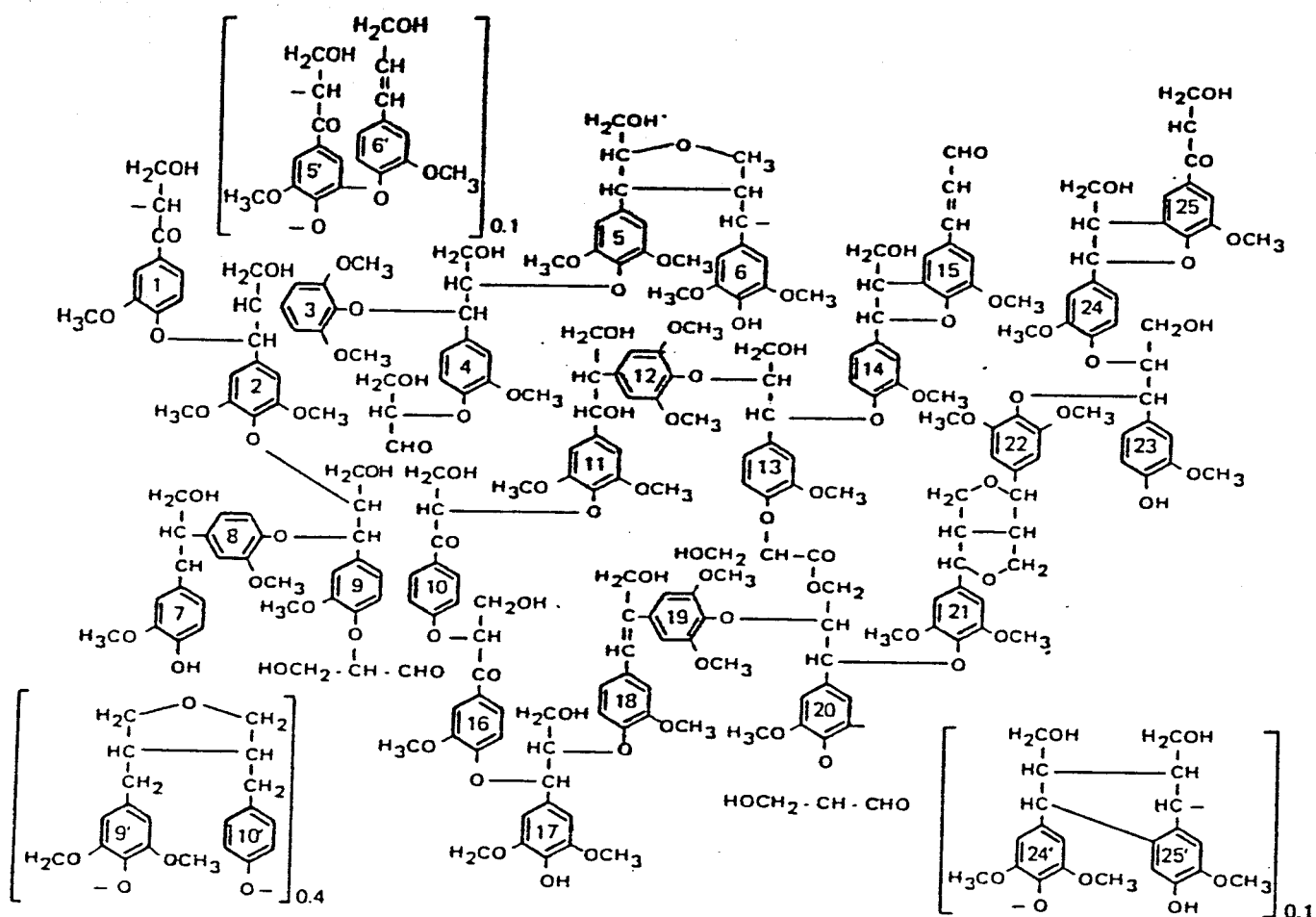


Fig. 5 : Structure théorique de la lignine proposée par NIMZ (1974)

représente un ensemble complexe d'espèces végétales dans lesquelles la présence de la lignine guaiacyle-syringyle n'est pas toujours facilement définissable.

Cette classification est considérée comme convenable par SARKANEN (1971) et HERGERT (1960) qui cependant, remarquent le caractère approximatif d'un tel système taxonomique basé sur certaines caractéristiques physico-chimiques (spectre infrarouge et oxydation au nitrobenzène). Car la nature de la lignine, même dans une même plante, est susceptible de varier, ce qui pourrait provoquer la coexistence des deux types de lignine dans des différentes parties d'une même plante.

PROPRIETES PHYSIQUES

La lignine étant facilement modifiée par des réactions chimiques simples, ses propriétés physiques varient très rapidement. La lignine d'hydrolyse présente des propriétés semblables à celles du bois lui-même. Sa densité varie de 1,35 à 1,50. La lignine n'a pas de point de fusion, elle ramollit ou fond entre 135 et 195 °C. Elle se décompose à partir de 270 °C. Le poids moléculaire moyen de la lignine après extraction a été calculé entre 5000 et 10.000, cependant l'éventail des poids moléculaires est très large [DUMON et GELUS, 1982].

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

La lignine naturelle ou protolignine est considérée comme un "polymère tridimensionnel en réseau" qui s'étend entre les cellules en incrustant leurs parois. La présence des fonctions phénoliques et des liaisons éther rend la lignine réactive et insoluble. Cette insolubilité provient de l'interconnection de chaînes oligomères par un mécanisme de polymérisation qui amène à la formation d'une macromolécule infinie dont le degré de polymérisation n'est limité que par le volume disponible [FLORY, 1975]. Il a été observé que les cinétiques d'extraction des lignines en milieu alcalin ou acide sont polyphasiques et que les différentes couches des parois cellulaires ne sont pas délignifiées à la même vitesse. [GORING, 1959]. Cet auteur signale aussi qu'il pourrait exister une hétérogénéité chimique des lignines au niveau subcellulaire.

LES PROCEDURES D'EXTRACTION ET D'ISOLEMENT DES LIGNINES

A.- LES PRETRAITEMENTS DES RESIDUS LIGNOCELLULOSIQUES

Mis à part les procédés utilisés dans l'industrie de papier, il y a eu depuis longtemps des expériences tendant à augmenter l'efficacité d'utilisation des résidus lignocellulosiques, surtout les résidus agricoles dont l'utilisation comme aliment pour le bétail reste limitée vu leur digestibilité réduite. DEMEYER (1981), considère que le prétraitement chimique serait utile pour la rupture des complexes hémicellulose-lignines, favorisant donc la digestibilité des lignocelluloses. Au niveau de laboratoire et même à l'échelle pilote, il existe actuellement un grand nombre de procédés physiques ou physico-chimiques qui permettent la récupération des polysaccharides des résidus lignocellulosiques, procédés qui laissent la lignine comme sous-produit ou déchet.

Les procédés dénommés de délignification comprennent:

- l'utilisation des conditions sévères d'alcalinité et température [BACCAY et HASHIMOTO, 1984, CHYNOWETH et JERGER, 1985, CUNNINGHAM et CARR, 1984, HASHIMOTO, 1982 et 1986, Mc DONALD *et al.*, 1983].

- les traitements alcalins à la température ambiante, essentiellement en utilisant la soude [Mc CARTY *et al.*, 1976, MIRON et BEN-GHEDALIA, 1981, MOLINA *et al.*, 1984, PAVLOSTATHIS et GOSSETT, 1985, VAN SOEST, 1981, DATTA, 1981].

- l'extraction par des solvants organiques tels que l'éthanol

[AVGERINOS et WANG, 1983, CARIOCA *et al.*, 1985] ou le méthanol et la n-butylamine [TANAKA *et al.*, 1985].

- l'application de conditions extrêmes de pression et température [BROWNELL *et al.*, 1986, DALE et MOREIRA, 1982, PLAYNE, 1984, RUBIO TORRES *et al.*, 1986].

B.- PROCEDURES D'EXTRACTION DES LIGNINES

Le traitement des matériaux lignocellulosiques pour la séparation de ses composants peut être envisagée, soit par la solubilisation de la fraction polysidique, c'est à dire par l'extraction de la cellulose et des hémicelluloses, ou bien, en visant d'abord à l'extraction de la lignine, par solubilisation soit dans des solvants organiques soit dans des solutions alcalines.

I. Méthodes basées sur la solubilisation des polyosides [NIKITIN 1962]

1.- Lignine de KLASON

La méthode de KLASON est souvent utilisée pour le dosage de lignine. La lignine KLASON est le résidu du traitement du matériel lignocellulaire avec H_2SO_4 (64 ou 72%) c'est une lignine très modifiée.

2.- Lignine de WILLSTÄTTER

Elle se prépare avec HCl à 41-42 %; c'est une lignine très inadaptée pour des études de caractérisation.

3.- Lignine de FREUDENBERG

Elle est obtenue par traitement avec H_2SO_4 1% à ébullition et par

addition ultérieure de solution ammoniacale (à 0°C, sans O₂).

4.- Lignine periodate

C'est le résidu de l'oxydation des sucres du bois par Na₂H₂IO₆

[RITCHIE et PURVES, 1947].

II.- Isolement de la lignine par des solvants organiques en présence de catalyseurs acides [NIKITIN, 1962].

L'isolement se fait :

- Avec l'éthanol en présence de HCl sous reflux, pour obtenir une lignine-éthanol.
- Par immersion dans HCl à 17,5% (24 à 30 h) au froid et puis extraction de la lignine avec l'acide acétique.
- Par chauffage avec du phénol à 100 °C en présence de H₂SO₄ à 0,1-1% comme catalyseur.
- Par acidolyse avec HCl à 0,1-0,3 % à 90 - 100°C dans le dioxane. Il y a des réactions de condensation et réduction du rendement en aldéhydes dosés par oxydation au nitrobenzène.

III.- Lignines solubles obtenues par extraction avec des solvants

1.- Lignine de BRAUNS (1939).

Elle est préparée par extraction avec l'éthanol à 95% à température ambiante, de matériel végétal broyé (maille 100-150). Ce type de lignine contient fréquemment davantage de groupements ester que les lignines broyées du bois (Milled Wood Lignin ou MWL).

2.- Lignines libérées enzymatiquement.

Il s'agit de lignines qui ont été préalablement soumises à l'action

d'une culture pure de champignon (Brown rot), et ensuite extraites avec l'éthanol 95%.

Les caractéristiques de ces préparations sont très semblables à celles des lignines de BRAUNS.

3.- Lignines de BJÖRKMAN (1957) ou lignines de bois moulus "milled wood lignins" (MWL)

Elles sont obtenues par broyage en présence de toluène et par extraction avec le mélange dioxane-eau (90:10 v/v). Cette préparation est dépourvue de cendres mais elle peut contenir jusqu'à 8% d'oxydes. Le broyage peut générer une réduction du contenu en méthoxyles ainsi qu'une dépolymérisation partielle. SARKANEN (1971) signale que la lignine MWL, malgré son utilité expérimentale, ne peut pas être considérée comme représentative de toute la lignine cellulaire, mais seulement de la fraction comprise dans la "lamella moyenne". SARKANEN remarque aussi la présence de contaminants autres que les sucres tels que certains constituants phénoliques dans certaines espèces végétales.

D'une façon générale, les obstacles principaux à l'extraction des lignines par des solvants organiques sont:

- a) l'existence de liaisons chimiques entre la lignine et les polyosides végétaux,
- b) le poids moléculaire élevé de la lignine,
- c) la formation probable de structures tridimensionnelles pendant le processus d'extraction [NIKITIN, 1962].

En plus, FREUDENBERG (1968) considère que les lignines extraites avec des alcools et des acides minéraux comme catalyseurs sont inadéquates pour des études de caractérisation, car les lignines ainsi obtenues sont modifiées par l'addition de groupements alkyles et d'anions organiques de même que par des réactions de condensation.

IV.- Lignines industrielles

1.- Lignines alcalines

La préparation de ce type de lignines à partir du bois demande un traitement hydrolytique très drastique (NaOH 5%, 130 à 170°C). En revanche, les lignines d'herbes peuvent être obtenues avec des rendements substantiels même avec des traitements alcalins modérés et à température ambiante [BECKMAN *et al.*, 1923]. Les lignines alcalines peuvent contenir comme impuretés carbohydrates, silice et matières protéiques.

2.- Lignines Kraft

Le procédé Kraft est le plus utilisé pour la fabrication de pâte à papier. Les réactifs principaux utilisés pour la délignification dans la méthode Kraft sont la soude et le sulfure de sodium. Les conditions d'alcalinité et de haute température conduisent à la formation des thiolignines (Figure 6 b, page 19) qui, par condensation ultérieure, donnent la lignine KRAFT.

3.- Lignines au sulfite

Les lignines au sulfite sont préparées par passage de SO_2 sur une colonne de $CaCO_3$ ou MgO ou dans une solution d'ammoniaque ou de soude. La concentration totale de SO_2 (en poids) dans la solution est de 4 à 7%. Cette procédure produit des lignosulfonates [SARKANEN, 1971] (Figure 6 a, page 19).

Les différents produits obtenus par les procédures précédentes doivent en principe posséder des caractéristiques physico-chimiques différentes les uns des autres, car les conditions pour leur obtention diffèrent. Cependant, MONTIES (1982) signale que pour les lignines d'extraction solubles, malgré les variations en polydispersité résultant de la procédure d'extraction utilisée, certains paramètres analytiques tels que l'absorption dans l'ultraviolet et l'infrarouge, l'indice de réfraction, la

viscosité intrinsèque et la forme des agrégats vus en microscopie électronique ne montrent pas de différences importantes d'une lignine à l'autre. Cette particularité des lignines d'extraction soluble est très utile pour des études de biodégradabilité de lignine, car elle permet de choisir la méthode d'extraction la plus adaptée à chaque type d'expérience.

LA BIODEGRADATION DES LIGNINES ET DE LEURS DERIVES

Il existe dans la nature des mécanismes biologiques de dégradation de la lignine qui empêchent l'accumulation de ces molécules et qui permettent leur réincorporation dans le cycle biologique du carbone. Il semblerait que la biodégradation de la lignine soit le résultat de l'action combinée de différents champignons et bactéries constituant la microflore du sol.

[JANSHEKAR et FIECHTER, 1983].

A.- LA DEGRADATION DES LIGNINES EN AEROBIOSE

I.- Champignons capables d'utiliser la lignine

Selon le type de détérioration qu'ils provoquent dans le bois mort, sur lequel ils se développent, les champignons ligninolytiques sont de trois types, à savoir:

- les pourritures blanches ou pourritures cubiques (Basidiomycètes et quelques Ascomycètes),
- les pourritures brunes ou pourritures fibreuses (Basidiomycètes)
- et les pourritures molles (Ascomycètes et Fungi imperfecti).

Il est généralement accepté que les polymères complexes de la lignine sont d'abord attaqués par les Basidiomycètes et substantiellement dégradés par quelques Ascomycètes et Fungi imperfecti [KIRK, 1981].

Les champignons de la pourriture blanche attaquent les polymères de

lignine, occasionnant la rupture des liaisons inter-lignols telles que C α -C β , β -aryl éther, C1-C α et liaisons des cycles aromatiques (Figures 1 et 4, pages 4 et 8).

Une oxydation du C α et de liaison C α =C β est aussi possible de même qu'une hydroxylation aromatique et une déméthylation des groupes méthoxylés.

Les champignons de la pourriture molle sont capables de dégrader le bois dans des conditions d'humidité élevée. Ce type de pourriture dégrade la lignine de façon lente et incomplète. La caractéristique principale de la pourriture molle est la diminution de la résistance mécanique de la surface des tissus végétaux attaqués. Du point de vue chimique, TROJANOWSKY (1977) considère que les champignons de pourriture molle sont capables d'attaquer les groupements méthoxyles, les liaisons aryl-alkyl éther des maillons propane, et d'ouvrir les noyaux aromatiques. Ces résultats ont été vérifiés par KIRK *et al.* (1981), quoiqu'en utilisant des souches différentes de pourriture molle.

En ce qui concerne la pourriture brune, ces champignons sont fondamentalement humifères et provoquent seulement des changements limités dans la lignine. Ce type de pourriture décompose principalement les polysides. Cependant, certaines altérations, telles que la déméthylation des groupements méthoxyles, l'hydroxylation aromatique et une oxydation limitée des chaînes latérales ont été détectées. Les champignons de pourriture brune n'ouvrent pas les anneaux aromatiques de façon efficace [ODIER, 1986].

Selon KIRK [1973 et 1975], la différence essentielle entre les pourritures brunes et les pourritures blanches du point de vue de la dégradation de la lignine réside dans le fait que les champignons de pourriture brune ne possèdent pas les enzymes capables d'ouvrir les noyaux aromatiques.

La pourriture brune, d'ailleurs, ne semble pas non plus capable d'attaquer les maillons propane, ni posséder la quinone oxydoréductase, enzyme que l'on trouve chez les champignons de pourriture blanche [ODIER, 1986].

A part le type de champignon utilisé, le type de lignine affecte aussi la vitesse de dégradation de la lignine. En général, la lignine des bois durs (angiospermes) est plus facilement dégradée par les champignons que le bois des bois tendres (gymnospermes) [JANSHEKAR et FIECHTER, 1983]. HIGHLEY (1982) remarque que le type plus que la quantité de lignine constitue un facteur important dans la lente dégradation des bois tendres.

Finalement, il faut remarquer que la pourriture blanche est le type de dégradation fongique de la lignine la plus importante et que l'espèce la plus étudiée parmi les champignons de pourriture blanche est *Phanerochaete chrysosporium*. Les ligninases de *P. chrysosporium* ont été mises en évidence par KIRK *et al.* (1978 et 1982), BUSWELL *et al.* (1982), LEATHAM et KIRK (1983), BUSWELL *et al.* (1984). Récemment, KIRK (1986) a signalé la caractérisation, purification et production des ligninases ainsi que son utilité potentielle.

II.- Actinomycètes utilisateurs de lignine

Parmi les Actinomycètes, *Streptomyces viridosporus* a montré une activité ligninolytique importante; CRAWFORD et POMETTO III (1983) rapportaient jusqu'à 30% de dégradation de la lignine d'un substrat lignocellulosique après incubation à 37°C, pendant huit semaines, dans des cultures à l'état solide. Dans la lignine dégradée par les Actinomycètes, on notait une baisse en carbone et un enrichissement en oxygène et hydrogène, ainsi qu'une déméthylation extensive, ce qui amène à considérer l'action de *S. viridosporus* comme essentiellement oxydative [CRAWFORD *et al.*, 1982].

Des Actinomycètes capables de dégrader la lignine tels que *Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermonospora*, *Micronospora* ont été identifiés par plusieurs chercheurs [CRAWFORD *et al.*, 1979, 1982 ; DESCHAMPS et LEBEAULT, 1980; GRADZIEL *et al.*, 1978 ; Mc CARTHY et BRODA, 1984 et TROJANOWSKI, 1977].

La souche de *Nocardia* isolée par TROJANOWSKI *et al.*, 1977 est capable d'attaquer des DHP (déhydroxypolymères de lignines) marqués au niveau du cycle et produire $^{14}\text{CO}_2$, ainsi qu'au niveau du maillon propane ou des méthoxyles, et même la lignine de maïs marquée.

Dans leurs études sur l'activité ligninolytique des *Streptomyces*, CRAWFORD *et al.* (1979, 1982) ont trouvé que *Streptomyces flavovirens* était capable de produire des pertes de poids de phloème de Pin de DOUGLAS allant jusqu'à 47% en 12 semaines. L'attaque s'effectue surtout sur la fraction polysaccharidique des parois végétales, mais la lignine montrait une certaine déméthylation et décyclisation. D'autres espèces de *Streptomyces* ont été signalées comme ligninolytiques [CRAWFORD, 1978 ; PHELAN et CRAWFORD, 1979]; cependant, les taux de biodégradation restaient faibles. Deux souches de *Streptomyces* apparaissent comme les plus actives, *Streptomyces badicus* 252 et *Streptomyces viridosporus* T7A, qui peuvent dégrader jusqu'à 10% de la lignine en $^{14}\text{CO}_2$.

HAIDER *et al.* (1978) ont comparé l'activité biodégradative de diverses souches de *Nocardia* ; ils considéraient qu'étant donné que les souches étudiées étaient non cellulolytiques, l'attaque sur la lignine était limitée essentiellement par son accessibilité.

III.- Action des levures sur la lignine

Certaines levures telles que *Candida* ont été cultivées dans un milieu contenant glucose et lignine KRAFT [CLAYTON et SRINIVASAN, 1981]. L'analyse par chromatographie sur gel a montré la disparition des aromatiques de petit poids moléculaire et l'apparition d'intermédiaires. Ceci a été interprété comme un indice de dégradation. BOURBONNAIS et PAICE (1987) ont isolé un champignon ressemblant à une levure (*Aureobasidium pullulans*) capable de pousser dans un milieu avec guaiacyl glycérol- β -guaiacyl éther comme seule source de carbone. Ce microorganisme poussait aussi sur des monomères phénoliques, tels que cinnamaldéhyde, syringaldéhyde, vanilline et veratraldéhyde.

Ces études montrent que la ressemblance physiologique entre levure et champignons pourrait s'élargir jusqu'à la capacité de dégradation de la lignine. Des expériences restent à réaliser pour démontrer cette possibilité.

IV.- Dégradation aérobie de lignine par des bactéries

Plusieurs bactéries aérobies non cellulolytiques gram-négatives ont été signalées comme étant capables de dégrader lignines au dioxane et les MWL de peuplier avec des rendements de biodégradation de 4 à 20% dans une période de 7 jours (pourcentage estimé à partir de l'absorbance à 280 nm de la lignine résiduelle dans le mélange dioxane-eau) [ODIER *et al.*, 1981]. Ces souches ont été identifiées comme *Pseudomonas*, *Xanthomonas* et *Acinetobacter*.

Des observations semblables avaient été réalisées par KAWAKAMI (1975) avec des différentes souches de *Pseudomonas*, mais surtout, il a isolé un

Pseudomonas ovalis qui dégrade l'acide vanillique via l'acide p-hydroxybenzoïque et non en acide protocatéchique comme c'est le cas général chez les *Pseudomonas*. MONTIES (1981) a montré par microscopie électronique que les parois primaires et secondaires du bois de peuplier pouvaient être délignifiées par *Pseudomonas*.

Les bactéries ont été aussi employées pour des expériences sur la dégradation des lignines industrielles, la biodégradation de dichlorophénol et d'autres chlorobenzoates a été démontrée [NEILSON, 1981]. L'utilisation significative de la lignine KRAFT (16-98% en 5 jours) par des bactéries mésophiles et thermophiles a été rapportée par DESCHAMPS (1980). Cependant, JANSHEKAR *et al.* (1981) n'ont pas pu reproduire ces résultats en utilisant la souche d'aeromonas la plus active. Ces auteurs remarquent la possibilité de ce que certaines bactéries puissent dégrader la lignine uniquement en association avec d'autres souches.

Des souches de *Klebsiella planticola* ont dégradé lignosulfonates, lignines KRAFT purifiées et monomères phénoliques, montrant que le catabolisme des phénoliques dans ces bactéries ressemble à celui des *Pseudomonas* [COLONNA CECCALDI *et al.*, 1987].

En utilisant des modèles tétramères de lignine, JOKELA *et al.* (1985 et 1987) ont démontré qu'une culture mixte de bactéries provenant d'effluents de papeterie était capable d'utiliser les oligomères synthétiques de la lignine comme source de carbone. Par identification des intermédiaires JOKELA *et al.* (1987) ont établi la voie catabolique de ces composés. Ils concluent en l'existence chez les bactéries d'une séquence de réactions de dégradation des modèles de lignines complètement différente de celle observée chez les champignons.

En travaillant sur des effluents de papeterie, RAABE (1968) avait remarqué que ceux-ci ne sont que partiellement dégradés dans l'environnement aquatique. Des observations semblables ont été réalisées par CRAWFORD *et al.* (1977) qui, d'ailleurs, ont signalé que les fractions de lignine de poids moléculaire moins élevé, étaient attaquées plus rapidement par les bactéries. Ces auteurs considèrent que les changements chimiques introduits dans la lignine produite par des procédés industriels (méthode KRAFT) peuvent réduire la biodégradabilité de ce type de lignines.

En revanche, FORNEY et REDDY (1982) ont préparé une culture mixte de 22 souches de *Pseudomonas* capable d'utiliser la fraction de poids moléculaire plus élevé de la lignine KRAFT comme seule source de carbone. A la différence des expériences de CRAWFORD (1977) dont le milieu de culture consistait en des échantillons du sol ou d'eau auxquels on additionnait la lignine, FORNEY et REDDY (1982) ont utilisé un milieu synthétique dépourvu de glucose. D'autre part, l'aération dans les cultures de FORNEY et REDDY (1982) était réalisée par convection, tandis que CRAWFORD utilisait une circulation d'air forcée. Ces deux facteurs pourraient expliquer le désaccord entre les résultats présentés par ces deux groupes.

Conclusions sur la dégradation aérobie de la lignine

L'état actuel du développement des connaissances sur les mécanismes de la biodégradation aérobie de la lignine, essentiellement chez les champignons, permet d'envisager la production au niveau semi-industriel des enzymes ligninolytiques [HATAKKA *et al.*, 1987, WILLERSHAUSEN *et al.*, 1987]. De même, la manipulation génétique est déjà employée afin d'améliorer la performance dégradative des champignons [SJÖSTROM *et al.*, 1987 ; ALIC *et al.*, 1987; KATAYAMA *et al.*, 1987]. Les dernières découvertes sur la non spécificité

des ligninases isolées des champignons, ont permis de considérer son utilisation pour la dégradation d'autres composés aromatiques polluants tels que le pyrene [HAMMEL et al., 1987] ou bien des tannins, mélanines, composants du pétrole et des molécules abiotiques (créées par l'homme) [KIRK, 1987]. Malgré tous ces développements, au niveau de l'application industrielle, beaucoup de points restent encore à étudier avant d'arriver à obtenir un procédé performant pour la dégradation et valorisation de la lignine par cette voie.

B.- LA DEGRADATION ANAEROBIE DE LA LIGNINE

I.- Catabolisme des composés aromatiques en anaérobiose

Dans les voies aérobies ou le mécanisme fondamental de rupture des structures aromatiques implique l'utilisation des enzymes du type mono et di-oxygénase, l'oxygène est donc essentiel car il est incorporé dans les produits de réaction [HAYAISHI, 1964]. En revanche, dans les environnements anaérobies où l'oxygène libre est absent, les seules options disponibles pour le catabolisme des aromatiques sont l'hydratation ou l'hydrogénation suivie par une rupture non-oxydative du cycle aromatique. L'addition d'eau n'a pas été observée, elle semble d'ailleurs thermodynamiquement improbable [EVANS, 1977]. D'après DUTTON et EVANS (1968), la dégradation de substances aromatiques en anaérobiose, utilise le mécanisme de réduction initiale du cycle aromatique.

EVANS (1977) considérait qu'il existe au moins trois types de conditions biologiques dans lesquelles il est possible d'observer une dégradation anaérobie des noyaux benzène, à savoir:

1) Le photométabolisme anaérobie

Il nécessite la présence d'une membrane lumière-dépendante liée à un système redox de translocation de protons. Ce type de dispositif serait présent dans la famille des *Athiorhodaceae* (Figure 7, page 30).

2) Le métabolisme anaérobie du benzoate par la "respiration nitrate"

Une culture mixte, formée par deux organismes différents, a été isolée par OSHIMA (1965) à partir du sol. Ces bactéries étaient capables de pousser en anaérobiose sur une variété de substrats aromatiques en présence obligée du nitrate. Notons qu'une souche de *Pseudomonas* (PN) a été décrite par TAYLOR *et al.* (1970, 1972) comme ayant, aussi, un métabolisme anaérobie nitrate-dépendant d'acides aromatiques. Le mécanisme de dégradation proposé par EVANS (1977) (Figure 8, page 30) peut être résumé considérant qu'il est formé par une phase réductrice réalisée par un réducteur du type ferredoxine suivie par une séquence de β -oxydation et une rupture des cycles aromatiques vers la formation d'acides aliphatiques, étant donné que ces acides aliphatiques servent comme sources de carbone et d'énergie, une partie doit être oxydée et les coenzymes réduites résultantes doivent être ré-oxydées par une voie de translocation de protons au niveau de la membrane. Ce système est branché au nitrate par la chaîne de transport d'électrons à travers de la nitrate réductase.

La réduction du nitrate a été observé dans tous les types de sol, les boues activées et dans les sédiments marins et des eaux douces [JETER et INGRAHAM, 1981] ce qui mènerait à considérer qu'il existe un potentiel pour la dissimulation d'aromatiques via nitrate dans tous ces environnements [SLEAT et ROBINSON, 1984].

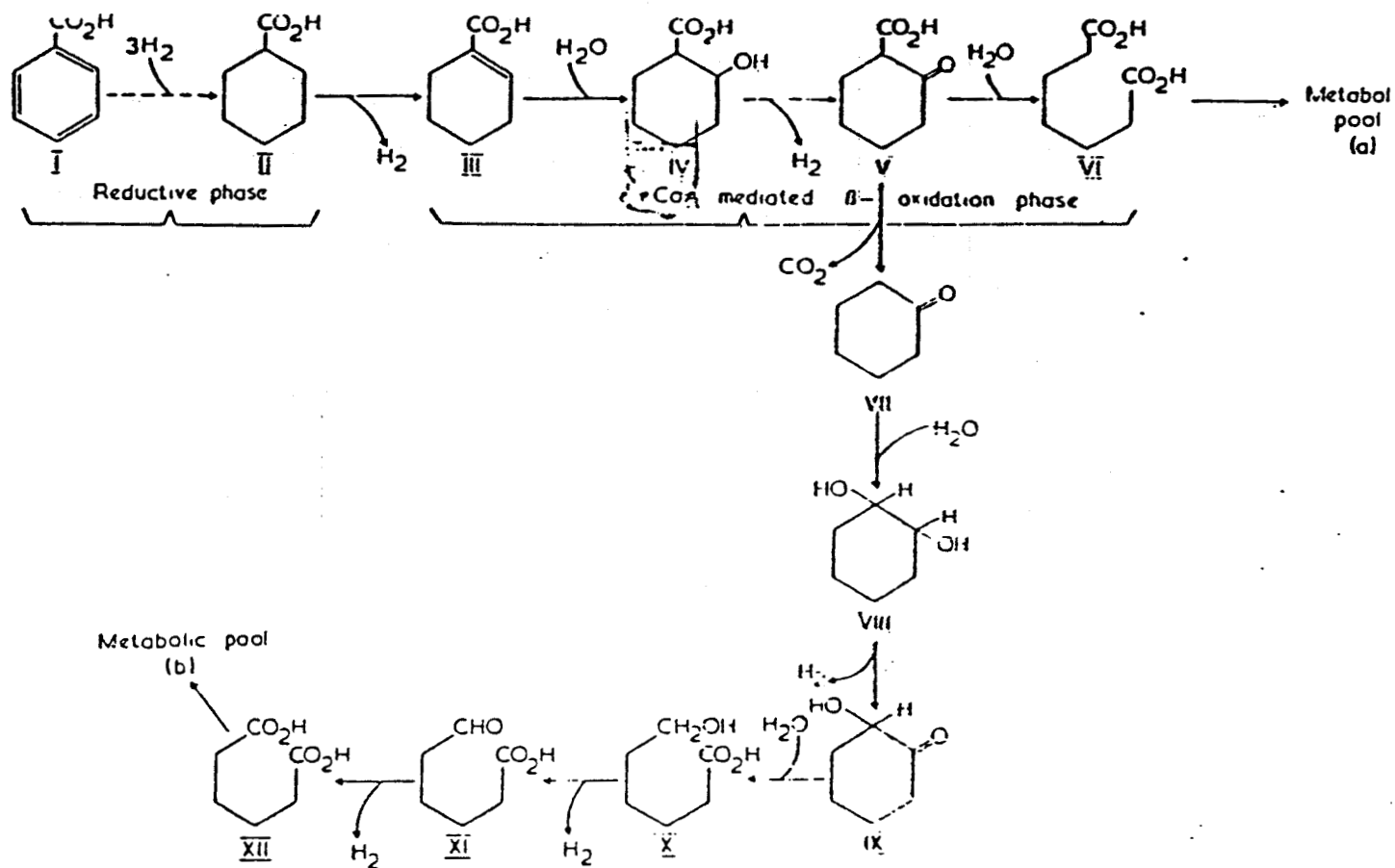


Fig. 7 : Photométabolisme anaérobie de l'acide benzoïque proposée par EVANS (1977)

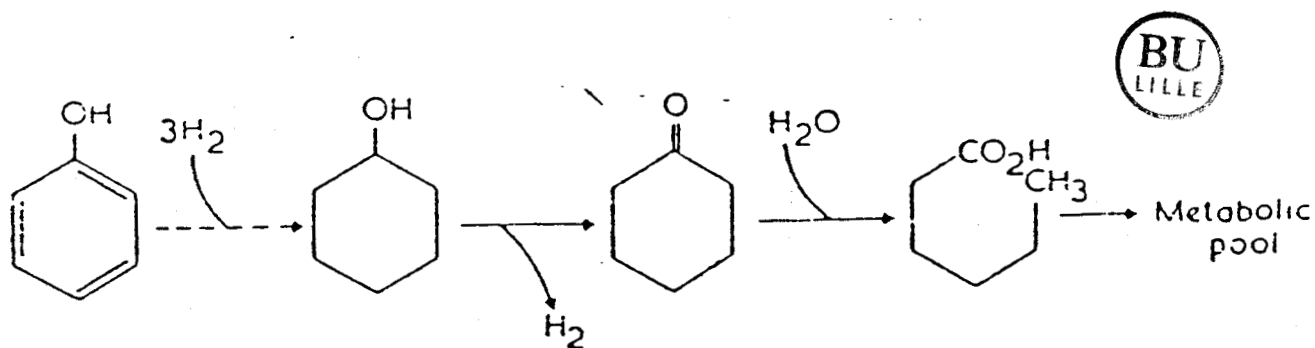


Fig. 8 : Mécanisme de réduction du phénol en anaérobiose (EVANS, 1977)

HUTBER et RIBBONS (1983) ont détecté chez *R. palustris* une activité benzoylCoA synthétase dans des conditions aérobies et anaérobies comme réponse au benzoate ou phényl-hexano-carboxylate. L'induction de cet enzyme fournit l'évidence concernant la nature du substrat pour la réduction des cycles aromatiques. On considère que ce mécanisme joue un rôle important dans la dégradation de composés aromatiques simples dans des environnements anaérobies aquatiques et du sol.

Le mécanisme d'oxydation anaérobie du p-crésol a été décrit par BOSSERT et YOUNG (1986). Une souche dénitrifiante nommée PC-07, était capable d'enlever le groupement méthyle par des réactions de déshydrogénation pour produire le p-hydroxybenzoate. Les électrons enlevés au p-crésol étaient acceptés par le nitrate qui était réduit en N_2 . La séquence de réaction proposée par BOSSERT et YOUNG pour cette transformation est indiquée à la Figure suivante (Fig.9).

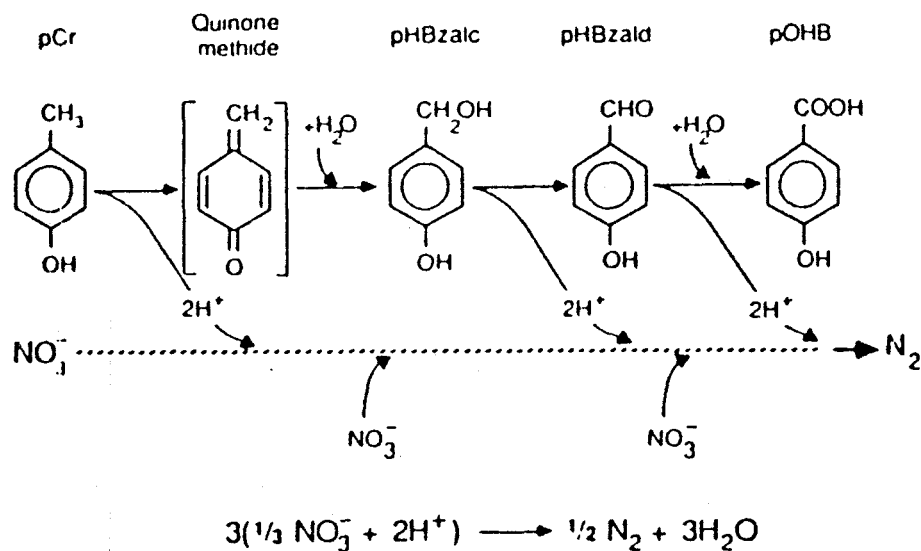


Fig. 9 : Voie métabolique proposée pour l'oxydation anaérobie du p-crésol en p-hydroxybenzoate dans des conditions dénitrifiantes.

(pHBzalc=alcool p-hydroxybenzylique; pHBzald=p-hydroxybenzaldehyde)

Ce mécanisme diffère de celui proposé par BAKKER (1977) qui implique une hydrogénation suivie d'une rupture du cycle aromatique sans métabolisme du groupement méthyle. Un deuxième organisme (PB-04) était capable de cataboliser l'acide p-hydroxybenzoïque, toujours en utilisant le nitrate comme accepteur d'électrons [BOSSERT *et al.*, 1986].

3) La fermentation méthanique par des cultures mixtes.

a) Le cas du benzoate:

La transformation de certains composés aromatiques en méthane en CO₂ a été démontrée par TARVIN et BUSWELL (1934). Le mécanisme biochimique de cette transformation implique la réduction préalable du cycle aromatique, cependant les composés intermédiaires résultant de cette réduction varient selon le type de culture utilisé [BALBA et EVANS, 1977 ; KEITH *et al.*, 1978 ; SCHLOMI *et al.*, 1978].

FERRY et WOLFE (1976) ont signalé la nécessité de la présence d'un consortium bactérien pour la méthanisation du benzoate. Le métabolisme anaérobie du benzoate par des voies méthanogènes s'effectue en plusieurs étapes, la première, la réduction et rupture du noyau aromatique est endergonique et elle doit être liée au stage de dégradation des acides aliphatiques (qui elles sont exergoniques) produits durant la première étape. Cette dégradation produit l'acétate, hydrogène et dioxyde de carbone dans des conditions de basse pression d'hydrogène [McINERNEY *et al.*, 1981]. Les acides aliphatiques, générés par la première phase du métabolisme anaérobie du benzoate avaient été identifiés par KEITH (1972) et ultérieurement par EVANS (1977) qui a proposé le schéma suivant pour la méthanisation du benzoate (Figure 10, page 33).

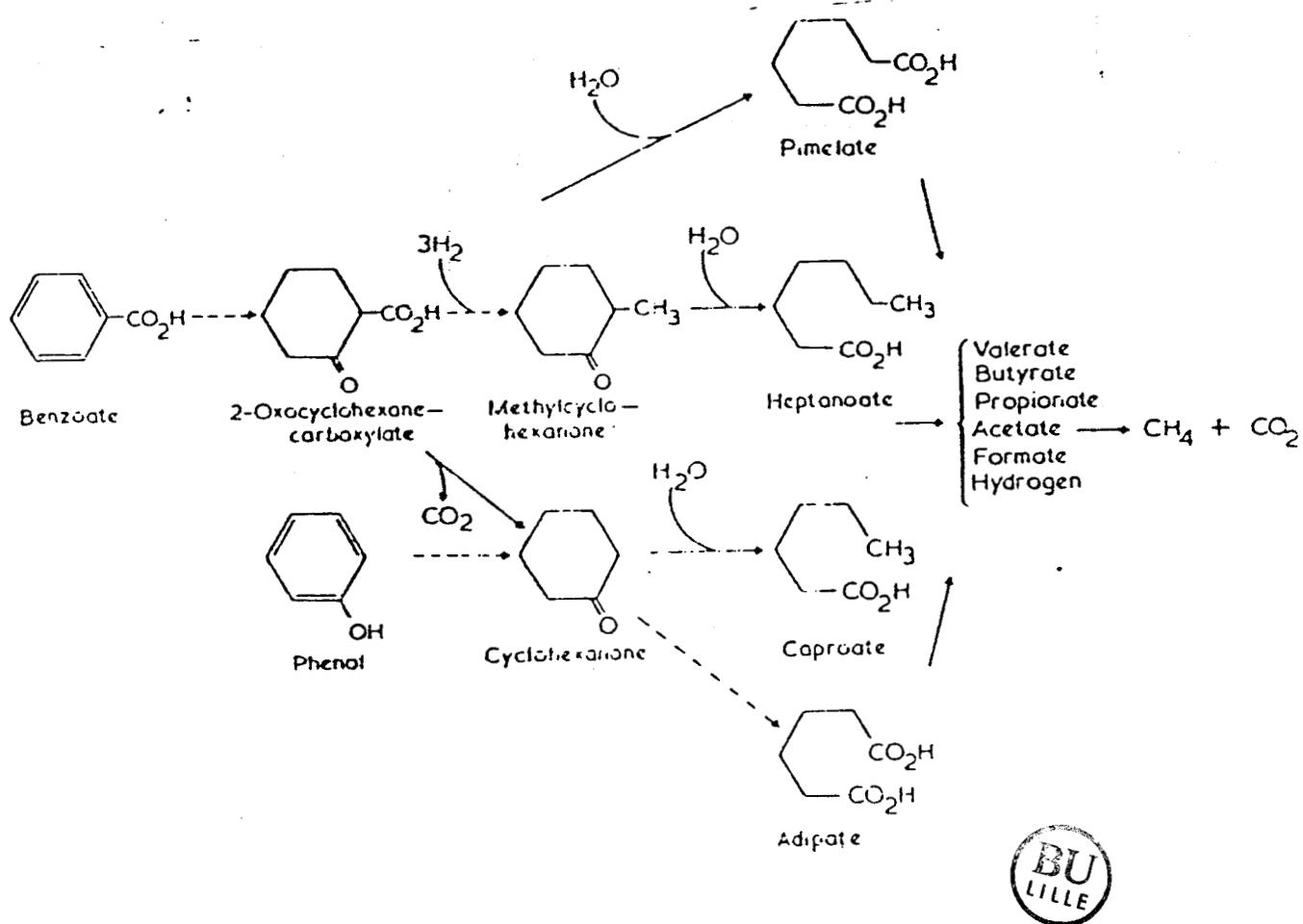


Fig. 10 : Voie métabolique anaérobie pour la méthanisation du benzoate



Le schéma montre que le benzoate et le phénol pourraient être catabolisés via la cyclohexanone, mais aussi qu'il y aurait au total quatre voies possibles de dégradation du benzoate dont deux communes au phénol.

Le schéma de méthanisation de l'acide benzoïque proposé par KEITH *et al.* (1978) diffère de celui de BALBA et EVANS (1977) car il ne montre pas (Figure 11) la formation du 2-oxocyclohexane-carboxylate, ni de méthylcyclohexanone ou de cyclohexanone, mais il propose seulement la réduction du cycle aromatique suivie de la rupture de celui-ci et puis la formation des acides gras volatils précurseurs du méthane et CO_2 .

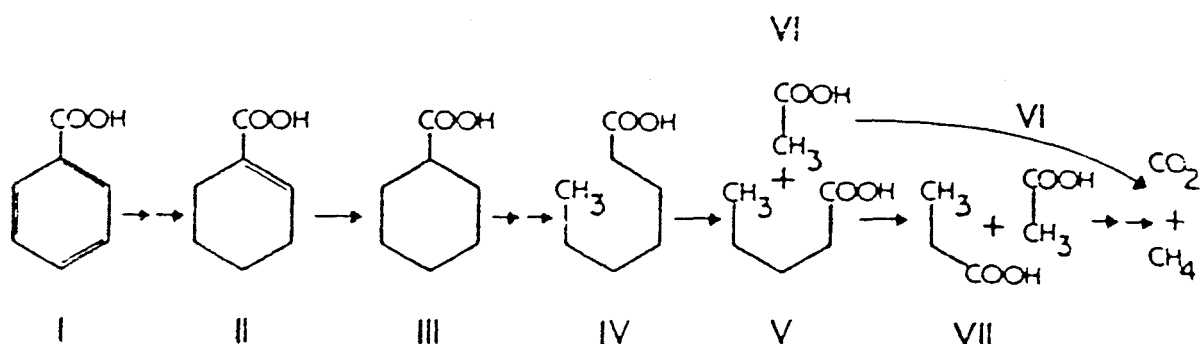
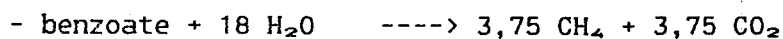
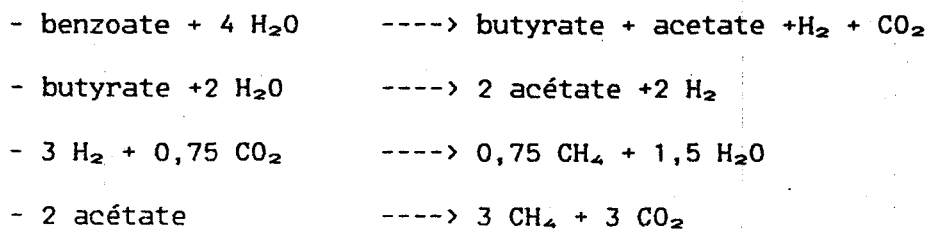
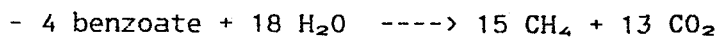


Fig.11 : Voies métaboliques proposées pour la transformation de l'acide benzoïque en CH_4 et CO_2 par un consortium microbien. (I)=ac. benzoïque; (II)=ac. 1-cyclohexène-1-carboxylique; (III)=ac. cyclohexane carboxylique; (IV)=ac. heptanoïque; (V)=ac. valérique; (VI)=ac. acétique; (VII)=ac. propionique.

L'apparition d'autres intermédiaires tels que le caproate a été souligné par SCHLOMI *et al.* (1978). La somme des réactions ayant lieu pendant la fermentation est la suivante:



ou

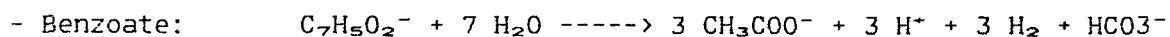


b) Aspects énergétiques de la dégradation anaérobie des phénols

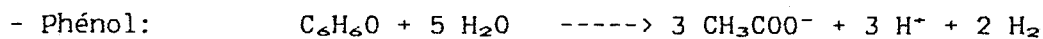
La dégradation des composés aromatiques en anaérobiose présente généralement un bilan énergétique défavorable par rapport aux voies aérobies. Ceci est mis en évidence par les bilans de variations d'énergie libre ($\Delta G'_{\circ}$) durant l'étape d'acétogénèse.



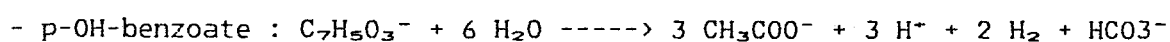
$$\Delta G'_{\circ} = 72,23 \text{ KJoule/mole}$$



$$\Delta G'_{\circ} = 70,56 \text{ KJoule/mole}$$



$$\Delta G'_{\circ} = 6,55 \text{ KJoule/mole}$$



$$\Delta G'_{\circ} = 5,38 \text{ KJoule/mole.}$$

Il est évident que les réactions indiquées ne peuvent pas se réaliser spontanément. C'est pour cette raison que FERRY et WOLFE (1976), supposant qu'il doit exister une consommation importante d'acétate de façon à déplacer l'équilibre vers la décomposition des composés phénoliques. Cette utilisation constante de l'acétate permettrait alors aux bactéries dégradatrices de benzoate d'obtenir l'énergie nécessaire pour la fission des cycles aromatiques.

Ces observations viennent renforcer l'idée qu'un consortium bactérien est nécessaire pour la méthanisation des composés tels que le phénol [HEALY et YOUNG, 1978]. Ceci n'est pas le cas pour certaines molécules aromatiques substituées (catéchol, pyrogallol, acide gallique) dont les bilans énergétiques sont favorables malgré l'accumulation d'acétate. Cependant, il a été observé [REID, 1979] que l'association avec des bactéries méthanogènes conduit à des bilans plus favorables.

Des essais de marquage des carbones du benzoate réalisés par FINA *et al.* (1978) et SCHLOMI (1978) ont montré que la décarboxylation du benzoate produit essentiellement du CO_2 , alors que les carbones du cycle sont transformés en proportion presque égale en CH_4 et CO_2 .

La probable carboxylation du phénol en acide benzoïque a été suggérée par NEUFELD (1980) ; cependant, il n'apporte pas de précisions sur le mécanisme.

La saturation du cycle benzénique apparaît comme une condition *sine qua non* pour la rupture et le catabolisme final du benzoate ou du phénol [KEITH et BRIDGES, 1978 ; FINA et BRIDGE, 1978].

D'autre part, la coopération syntrophique entre les bactéries

fermentatives des aromatiques et des méthanogènes s'avéra indispensable pour une dégradation complète de ces composés [SZEWZYK et SCHINK, 1985]. Par exemple, la dégradation de l'hydroquinone et du catéchol dépend de la présence de bactéries oxydatrices d'hydrogène, comme schématisé à la Figure 12 (page 38).

4.- Dégradation de composés phénoliques substitués

Des composés aromatiques autre que le benzoate sont susceptibles de dégradation en anaérobiose. Des produits de la ligninolyse ont été employés comme source de carbone par plusieurs chercheurs [HEALY *et al.*, 1978, 1979, 1980 ; SLEAT, 1981, 1983] dans des travaux sur la méthanisation de composés aromatiques. La transformation du tri-hydroxybenzoate en acétate, par des souches de *Pelobacter acidigallici* a été démontrée par SCHINK et PFENNIG (1982). La production de méthane était inhibée dans ces cultures par l'addition d'acide bromo éthane sulfonique (BESA).

Les souches isolées par SCHINK et PFENNIG (1982), produisaient l'acétate stoechiométriquement à partir de l'acide gallique, du pyrogallol, du 2, 4,6-tri-hydroxybenzoate et du phloroglucinol. Le fait qu'aucune de ces souches n'était capable de métaboliser le benzoate ou l'acide cyclohexane-carboxylique suggère que les mécanismes de rupture des noyaux benzéniques substitués sont différents de celui du benzoate [SLEAT et ROBINSON, 1984]. Cependant, OSHIMA (1965) et d'autres auteurs comme TAYLOR *et al.* (1970) et WILLIAMS et EVANS (1975) avaient démontré que les organismes capables de cataboliser le benzoate avec le nitrate comme accepteur d'électrons pouvaient aussi métaboliser d'autres composés aromatiques. TAYLOR *et al.* (1970) ont suggéré que le benzoate constitue un intermédiaire central dans la dégradation de composés aromatiques tels que m- et p-hydrobenzoate, protocatechuate, phenylpropionate et o-hydroxybenzoate. Cette opinion est aussi partagée par EVANS (1977). Dans

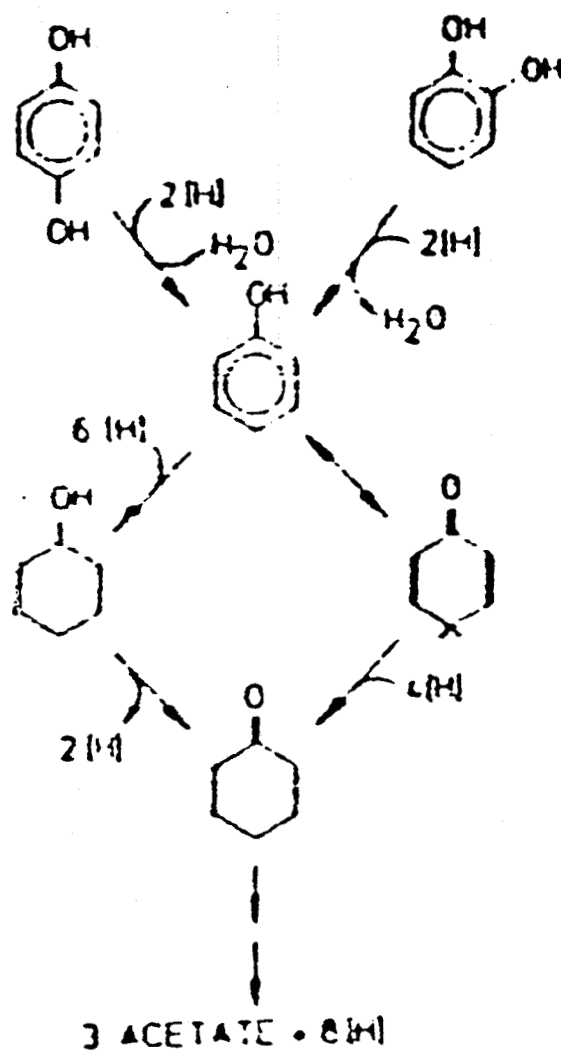


Fig. 12 : Biodégradation anaérobie de l'hydroquinone et du catéchol
(SZEWZYK et SCHINK, 1985)

leur étude sur l'espèce *Moraxella*, WILLIAMS et EVANS (1975) avaient montré que les cellules cultivées sur benzoate étaient aussi capables de dégrader d'autres substances aromatiques, telles que benzaldehyde, alcool benzylique, m- et p-hydroxybenzoate, phénylacétate, cinnamate, p-hydroxycinnamate, acide caféique et phloroglucinol. Cette bactérie n'était pas capable de dégrader le phénol, le cathéchol, le salicylate, le phtalate, le gentisate et le phenylpropionate.

S'il est vrai que la présence de cultures mixtes est nécessaire pour la méthanisation des substrats phénoliques, la fission des noyaux aromatiques ne dépend pas de l'activité des méthanogènes.

Ceci a été vérifié par KAISER et HANSELMAN (1982) dans des cultures d'enrichissement obtenues à partir des sédiments d'un lac d'eau douce, en utilisant syringols, catéchols et guaiacols comme substrats et par inhibition de la méthanogénèse avec le bromo éthane sulfonate.

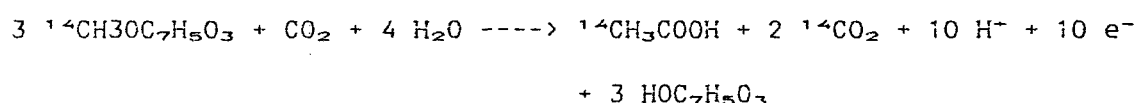
La méthanisation des phénols a été rapportée par HEALY et YOUNG (1978). Ils ont utilisé phénol et catéchol dans des essais d'acclimatation et pour des cultures d'enrichissement. L'inoculum pour ces expériences provenait de fluide du rumen. Un grand nombre d'autres monomères phénoliques substitués a été employé par HEALY et YOUNG (1979) dans des essais de méthanisation. Ils ont trouvé que le temps de latence (lag phase), la production de gaz et le rendement final de conversion en méthane et dioxyde de carbone dépendent du type de substrat. En revanche, la fission du noyau aromatique est évident pour tous les composés. Par ailleurs, la population bactérienne qui pousse sur un type de substrat possède peu de spécificité par rapport au composé phénolique de départ, ainsi plusieurs composés de structure similaire peuvent être métabolisés par une même culture (Tableau 1, page 40).

SUBSTRATE TO WHICH CULTURE ORIGINALLY ACCLIMATED	SUBSTRATE TO WHICH CULTURE IS SIMULTANEOUSLY ACCLIMATED
<chem>O=Cc1ccc(OC)c(O)c1</chem> VANILLIN	<chem>O=Cc1ccc(OC)c(OC)c1</chem> SYRINGALDEHYDE <chem>OC(=O)c1ccc(OC)c(O)c1</chem> VANILLIC ACID
<chem>OC(=O)c1ccc(OC)c(OC)c1</chem> SYRINGIC ACID	<chem>O=Cc1ccc(OC)c(OC)c1</chem> SYRINGALDEHYDE <chem>O=Cc1ccc(O)c(OC)c1</chem> VANILLIN
<chem>O=Cc1ccc(OC)c(OC)c1</chem> SYRINGALDEHYDE	<chem>OC(=O)c1ccc(OC)c(OC)c1</chem> SYRINGIC ACID
<chem>OC(=O)C(O)c1ccc(OC)c(O)c1</chem> FERULIC ACID	<chem>OC(=O)C(O)c1ccccc1</chem> CINNAMIC ACID <chem>O=Cc1ccc(O)c(OC)c1</chem> VANILLIN
<chem>OC(=O)c1ccc(O)c(O)c1</chem> 3,4-DIOXYBENZOIC ACID	<chem>OC(=O)c1ccccc1</chem> BENZOIC ACID <chem>Oc1ccccc1</chem> PHENOL
<chem>OC(=O)c1ccc(O)c(OC)c1</chem> VANILLIC ACID	<chem>O=Cc1ccc(OC)c(OC)c1</chem> SYRINGALDEHYDE <chem>OC(=O)c1ccc(OC)c(OC)c1</chem> SYRINGIC ACID <chem>O=Cc1ccc(O)c(OC)c1</chem> VANILLIN <chem>OC(=O)c1ccccc1</chem> BENZOIC ACID <chem>Oc1ccc(O)c(O)c1</chem> CATECHOL <chem>OC(=O)c1ccc(O)c(O)c1</chem> PROTCATECHUIC ACID



Tab. 1 : Composés phénoliques susceptibles d'être dégradés en anaérobiose

Le métabolisme des substituants des composés aromatiques constitue aussi un point d'intérêt, dans l'élucidation des schémas métaboliques anaérobies de ce type de molécules. FRAZER et YOUNG (1986) ont isolé une souche (TH-001) anaérobie stricte O-déméthoxylante. Leurs résultats montrent que le groupement méthoxyle est utilisé comme un substrat de croissance monocarboné ; ainsi ils indiquent que pour chaque carbone méthoxylique transformé en acétate, il y en a deux qui sont oxydés en CO₂. Le métabolisme de O-[méthyl-¹⁴C] vanillate par la souche TH-001 a été résumé par l'équation suivante:



La déméthylation de molécules lignoaromatiques par *Pseudomonas* sp. dans des conditions anaérobies a été rapportée par TAYLOR (1983). La souche utilisée pour ces expériences était capable de cataboliser en anaérobiose le ferulate guaiacol,3,4,5-triméthoxycinnamate-3,4,5-triméthoxybenzoate. La déméthylation de ces composés était également observée en aérobiose, mais la spécificité du système anaérobie était plus vaste.

Deux souches identifiées comme *Acetobacterium woodii* ont été isolées par BACHE et PFENNIG (1981) dans des cultures anaérobies d'enrichissement. L'utilisation de 10 composés phénoliques comme seule source de carbone amène à l'observation de réactions de déméthylation. Cette observation était vérifiée en utilisant des cultures pures de *A. woodii* qui étaient capables d'utiliser aussi bien le méthanol que les groupements méthoxylés pour les convertir en acétate.

Un schéma hypothétique de la dégradation anaérobie d'acide syringique a été proposé par KAISER et HANSELMANN (1982) (Figure 13, page 42), où la

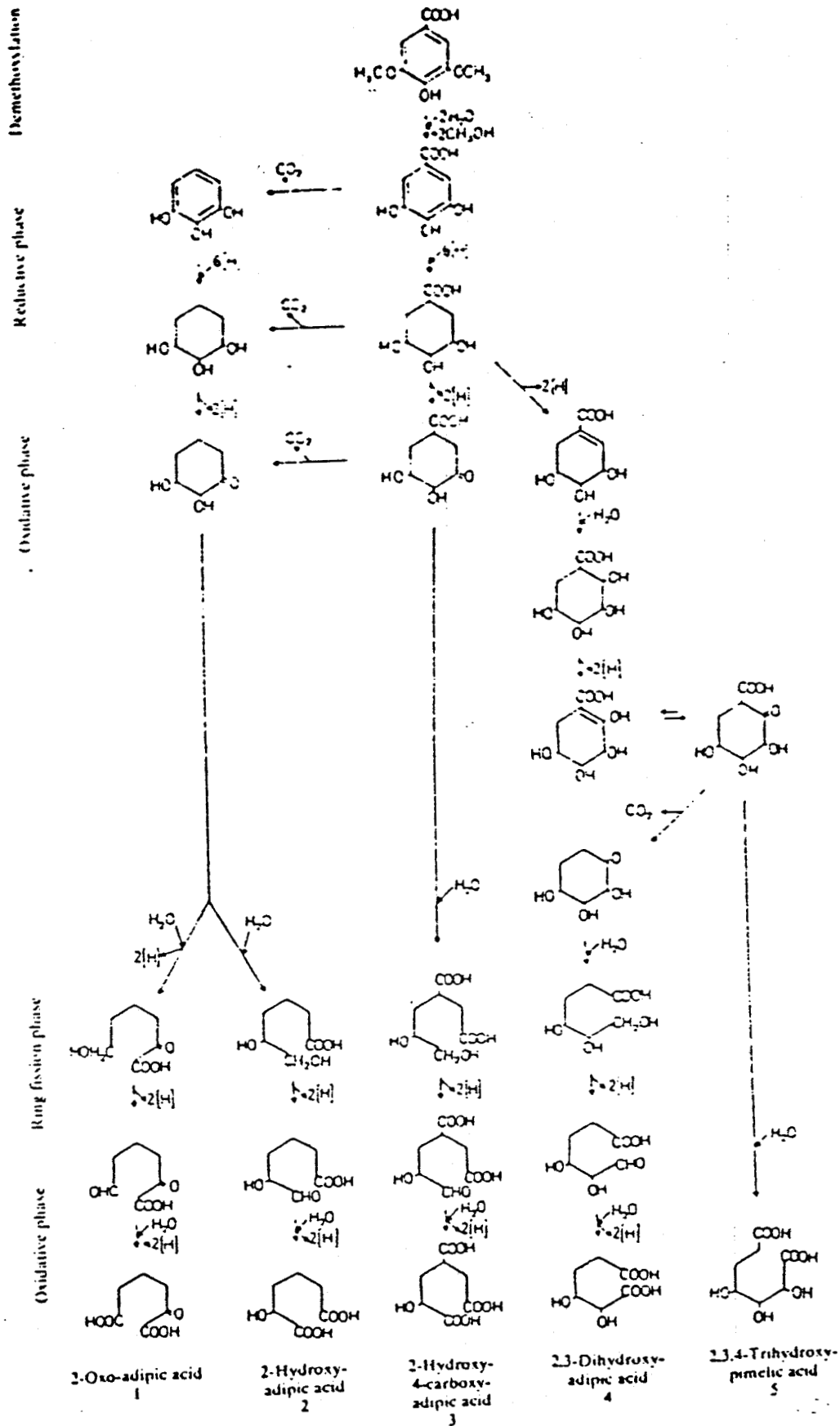


Fig. 13 : Voies métaboliques proposées pour la dégradation anaérobie de l'acide syringique (KAISER et HANSELMANN, 1982)

déméthoxylation apparaît également comme le premier pas dans le catabolisme des phénoliques, ces auteurs signalent aussi la nécessité de la présence d'une multiplicité de différentes espèces de bactéries pour arriver à observer une minéralisation complète de ce type de composés, car les interactions symbiotiques sont responsables de la régulation énergétique et de l'efficacité de la réaction. Ces interactions déterminent le type et la quantité de produits métaboliques finaux. La population bactérienne présente dans ces cultures pourrait diviser en trois types physiologiques (1) un groupe qui enlève les groupements méthoxyle (2) les bactéries responsables de la rupture fermentative du cycle aromatique des acides benzoïques hydroxylés et des benzènes et (3) les méthanogènes autotrophes.

KAISER et HANSELMANN (1982b) proposent que les voies du catabolisme des aromatiques doivent converger vers des composés plus simples comme le pynogallol, le catéchol ou le phénol (Figure 14, page 44). A cela doit être ajoutée l'observation de HEALY et YOUNG (1979) sur le fait qu'une culture enrichie sur acide syringique soit capable d'utiliser la vanilline et vice-versa grâce à l'interconversion par déméthoxylation de l'acide syringique en vanilline.

Les intermédiaires principaux dans la minéralisation des composés aromatiques sont directement méthanisables par des flores préalablement adaptées:

a) le phénol, dont la voie probable de dégradation a été décrite auparavant.

b) le catéchol, méthanisé dans les conditions décrites par HEALY et YOUNG (1978)

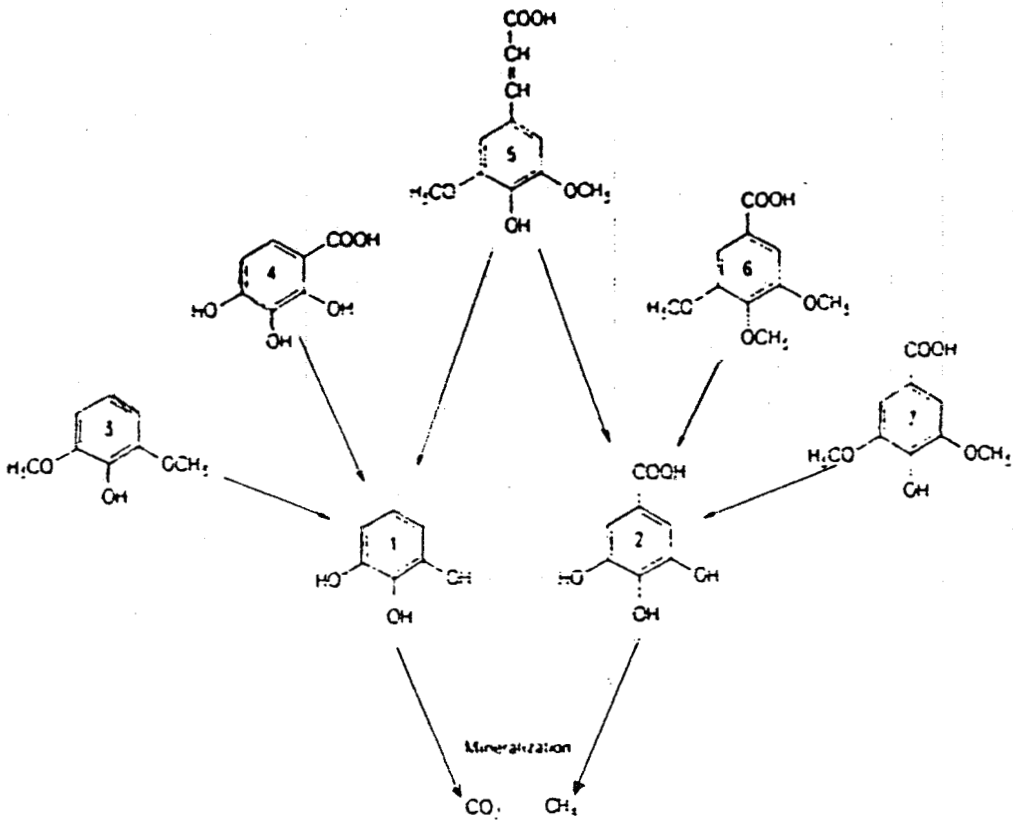


Fig. 14a : Minéralisation de composés aromatiques substitués. (1)=1,2,3-trihydroxybenzène; (2)=ac. gallique; (3)=1,3-diméthoxyphénol; (4)=ac. 2,3,4-trihydroxybenzoïque; (5)=ac. sinapique; (6)=ac. 3,4,5-triméthoxybenzoïque; (7)=ac. syringique.

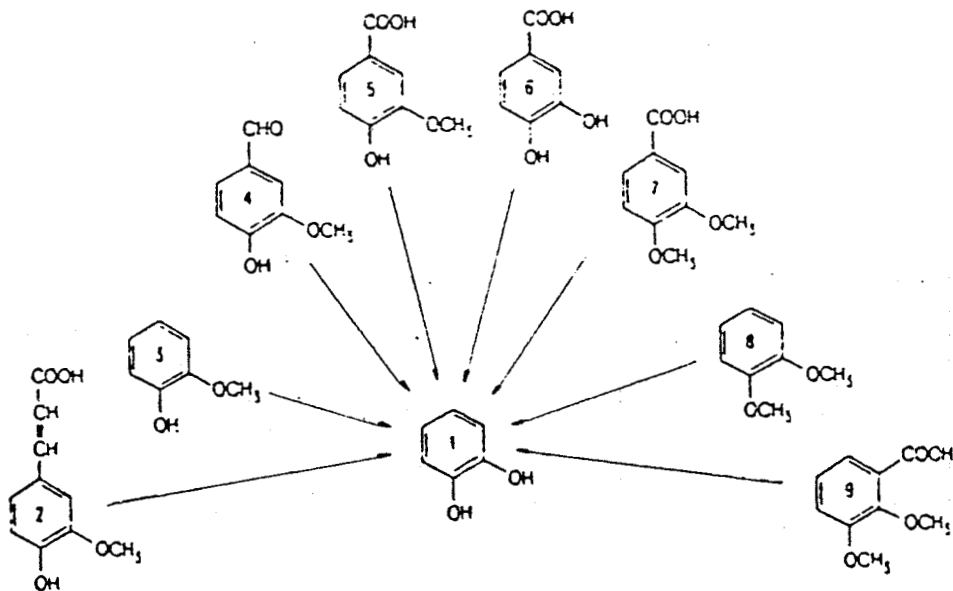


Fig. 14b : Transformation des aromatiques substitués en catéchol. (1)=catéchol; (2)=ac. 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique; (3)=2-méthoxyphénol; (4)=vanilline; (5)=ac. vanillique; (6)=ac. protocatéchuique; (7)=ac. vératrique; (8)=1,2-diméthoxybenzène; (9)=ac. 2,3-diméthoxybenzoïque.



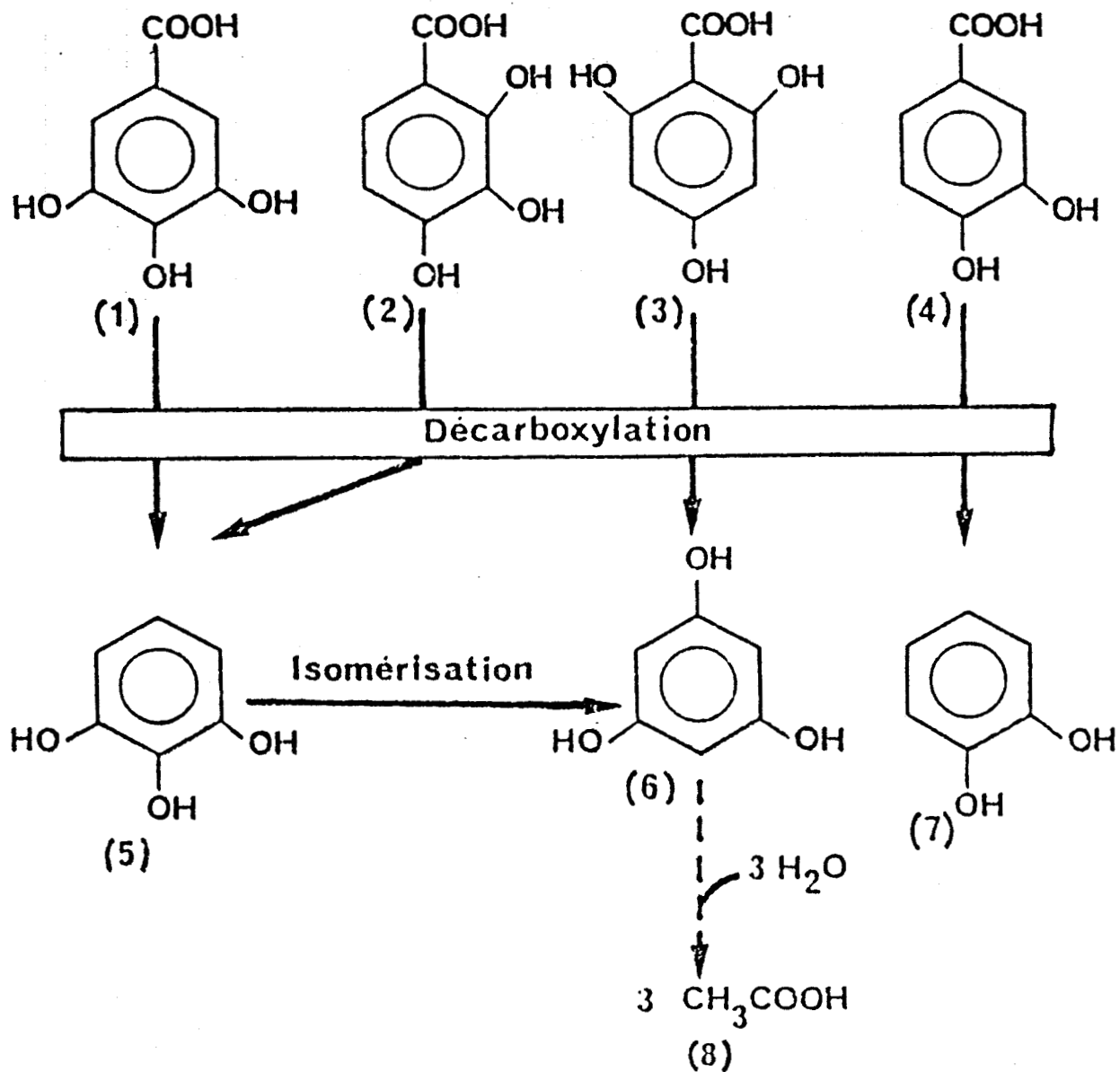


Fig. 15 : Transformation des composés phénoliques hydroxylés en anaérobiose (SAMAIN, communication personnelle)

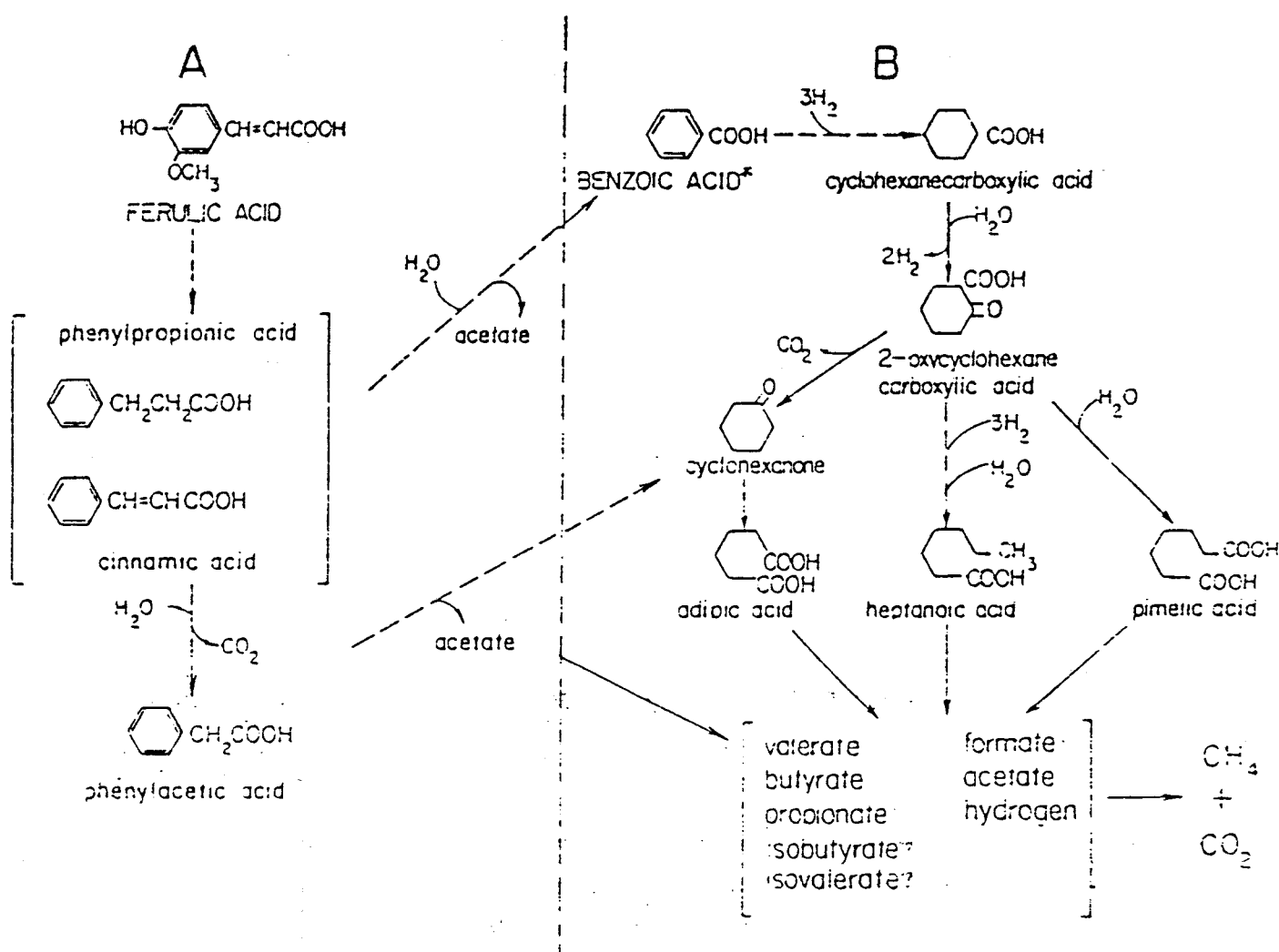


Fig. 16 : Voies de dégradation proposées pour les composés aromatiques (HEALY et YOUNG, 1980)

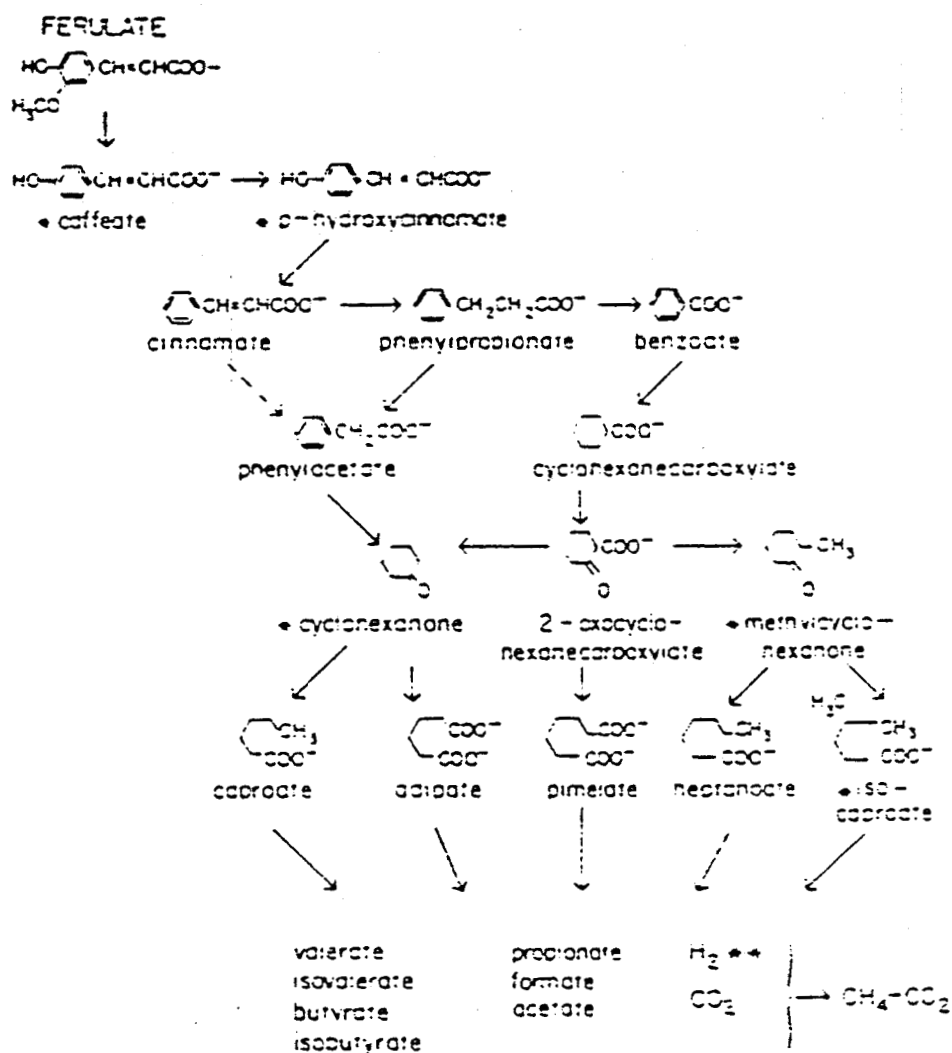


Fig. 17 : Voies métaboliques proposées pour la méthanisation du férulate (GRBIC-GALIC et YOUNG, 1985)

c) le pyrogallol, qui est dégradé par *Pelobacter acidigallici* [SCHINK et PFENNIG, 1982] ainsi que par la souche de AG2 isolée par SAMAIN (communication personnelle) qui utilise l'acide gallique et d'autres composés hydroxylés dans une fermentation homoacétique qui produit le phloroglucinol comme composé intermédiaire (Figure 15, page 45).

HEALY et YOUNG (1980) ont suggéré l'existence d'une voie de dégradation commune pour les composés aromatiques dans lesquelles des acides gras volatiles tels que le propionique, butyrique, isobutyrique et isovalérique (Figure 16, page 46) apparaissent comme produits de la rupture des cycles aromatiques.

Les intermédiaires de la dégradation de l'acide férulique identifiés par HEALY et YOUNG (1980) sont le cyclohexane carboxylate, le benzoate, le phényl acétate et le phényl propionate.

Dans une publication récente GRBIC-GALIC et YOUNG (1985) signalent l'identification des composés intermédiaires de la biodégradation anaérobie du férulate en CH_4 et CO_2 . A partir de ces résultats, ces auteurs proposent un schéma plus complet et détaillé de la méthanisation du férulate (Figure 17, page 47).

Cependant, OHMIYA et al. (1986) signalent l'importance de l'environnement sur les mécanismes des transformations des aromatiques. Ils comparent les intermédiaires produits lors du catabolisme du férulate par des bactéries isolées du rumen, essentiellement une souche de *Wolinella succinogenes*, avec ceux rapportés par GRBIC-GALIC et YOUNG (1985) analysés pendant l'incubation des bactéries (culture mixte) de boues d'un digesteur. Les réactions décrites par OHMIYA (1986) sont indiquées à la Figure suivante (Fig. 18).

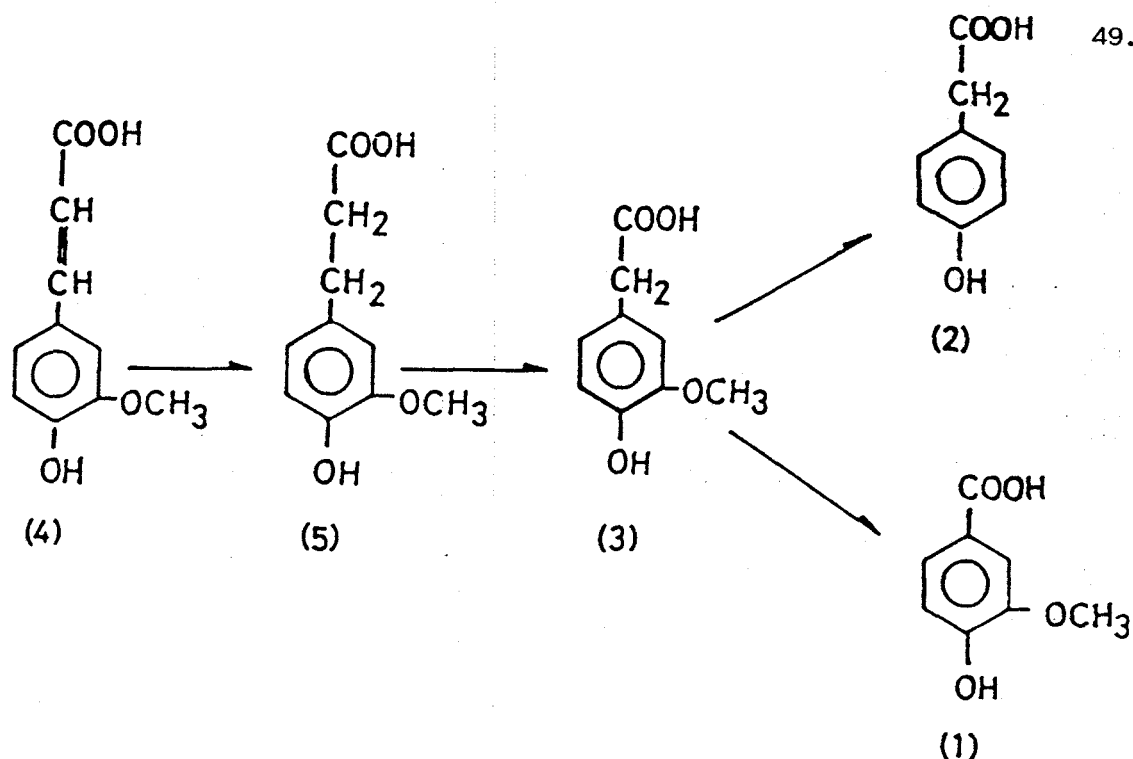


Fig. 18 : Transformation des composés aromatiques dans le rumen

D'après OHMIYA *et al.* (1986) leurs résultats suggèrent que l'acide férulique peut être modifié par la voie des anaérobies du rumen qui n'est pas forcément la même que celle des bactéries de boues du digesteur telles que celles utilisées par HEALY et YOUNG (1980).

Les études sur l'isolement des bactéries capables de transformer partiellement les composés aromatiques en anaérobiose se sont multipliées ces dernières années. Le but initial est de connaître la biochimie de ces transformations [BACHE et PFENNIG, 1981 ; MOUNTFORT et ASCHER, 1986] mais aussi d'essayer de combiner diverses organismes, les uns capables d'ouvrir le cycle benzénique et d'autres, méthanogènes optimisés qui seraient ensemble capables de dégrader complètement, des mélanges complexes d'aromatiques tel que l'ont montré KREIKENBÖHM et PFENNIG (1985).

L'inhibition de la méthanogénèse par addition du BESA provoque la formation de nombreux produits intermédiaires, qui normalement n'apparaissent pas quand on utilise une population mixte préalablement adaptée à la

phenylacétate, le 2-hydroxybenzoate, le 4-hydroxybenzoate, le 4-hydroxyphénylacétate, le p-crésol, l'indole, l'acide anthranilique et la phénylalanine. Le sulfate agissait en tant qu'accepteur d'électrons. Cependant, l'oxydation complète de substrats autre que l'acétate et le phénol n'a pas été démontrée. D'ailleurs, les expériences de BAK et WIDDEL (1986) montraient la possibilité de l'existence d'une autre voie dégradative pour le phénol, car la souche Ph01 isolée par eux, ne dégradait pas le cyclohexanal, la cyclohexanone, l'adipate ou le n-caproate, qui ont été indiqués par BALBA *et al.* (1980) comme intermédiaires de la dégradation anaérobie du phénol.

YOUNG et RIVERA (1985) soulignent le rôle central du phénol en tant qu'intermédiaire commun de la dégradation des composés phénoliques substitués soit par des groupements méthoxyles, méthyles ou hydroxyles, ou bien par des halogènes, principalement de chlore. En plus, les auteurs cités signalent que malgré le fait que les phénols puissent être méthanisés, plusieurs facteurs méritent d'être pris en considération, à savoir:

a) les périodes d'acclimatation des populations microbiennes à ce type de substrats sont relativement longues, et elles dépendent du composé à dégrader.

b) une adaptation graduelle, par l'utilisation au départ, de substrats non toxiques pourrait être nécessaire.

c) l'optimisation du temps de rétention de la population microbienne adaptée constitue un atout considérable dans la conception du procédé.

Le schéma proposé par YOUNG et RIVERA (1985) est présenté à la Figure suivante (Fig. 20).

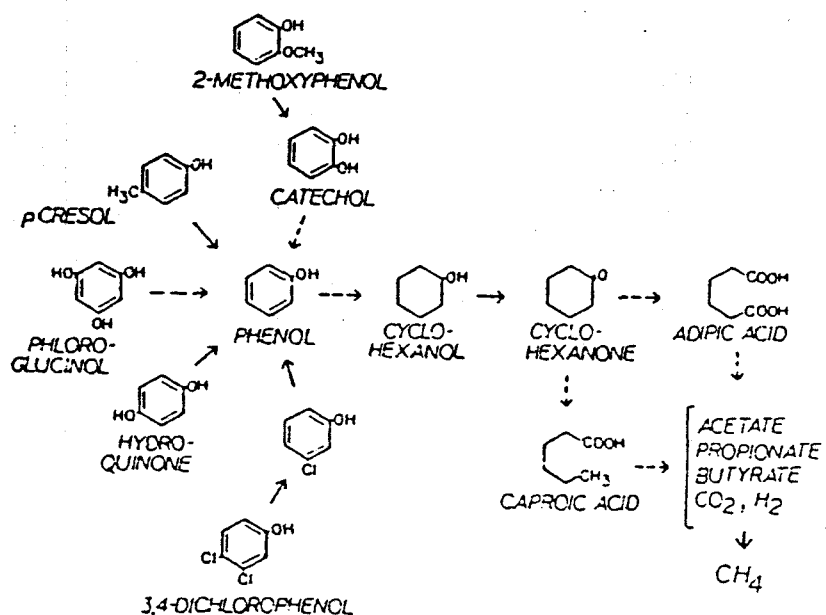
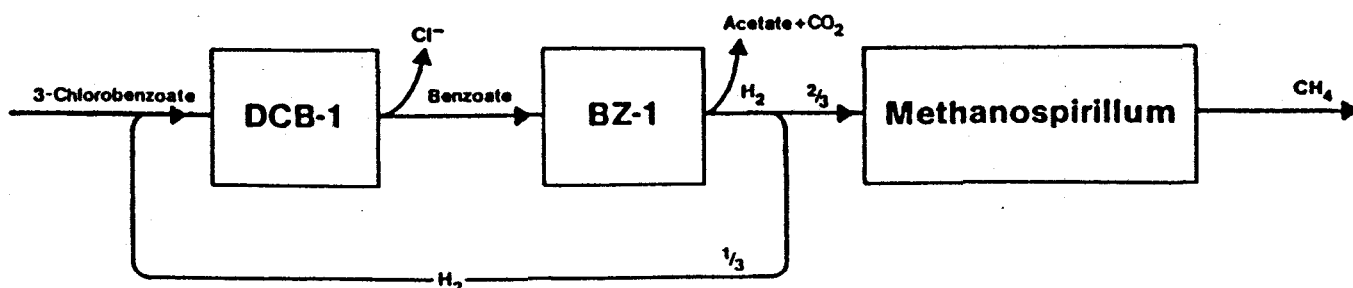


Fig. 20 : Voies métaboliques proposées pour la méthanisation des composés phénoliques substitués (YOUNG et RIVERA, 1985).

La méthanisation du 3-chlorobenzoate par un consortium bactérien pré-défini a été publiée par DOLFING et TIEDJE (1986). Les trois souches participantes forment ce que les auteurs appellent un "réseau" alimentaire (food web) par opposition à une chaîne alimentaire. Les fonctions des organismes sont spécialisées; il y a donc un organisme déchlorisant (souche CD B-1) un organisme dégradateur du benzoate (souche BZ-1) et un méthanogène lithotrophe (*Methanospirillum*, souche PM-1); les trois souches ont été isolées de boues d'enrichissement sur 3-chlorobenzoate. Les interactions entre les trois souches sont montrées par le schéma de la Figure suivante (Fig. 21).



Conclusions sur la biodégradation anaérobie des composés phénoliques

A partir des informations ci-mentionnées, les facteurs principaux jouant un rôle dans le métabolisme anaérobie des molécules aromatiques seraient :

a)- La réduction préalable du cycle aromatique, qui est indispensable pour sa rupture ultérieure,

b)- Les groupements méthoxyles ou halogènes, qui sont souvent catabolisés avant que les réactions de réduction et rupture ne se produisent

c)- Des composés phénoliques simples, tels que le benzoate, le phénol, le catéchol, le pyrogallol ou le phloroglucinol, qui apparaissent comme des intermédiaires dans la transformation des phénols. Le type d'intermédiaire dépendra du composé d'origine, ainsi que de la nature de l'inoculum bactérien,

d)- Les périodes d'adaptation des populations microbiennes aux substrats phénoliques, qui sont relativement longues,

e)- Au niveau cellulaire, les facteurs contrôlant la biotransformation des composés phénoliques qui seraient: la perméabilité de la membrane, la toxicité du composé, l'induction d'enzymes, le co-métabolisme, les mutations, les interactions microbiennes encore mal définies,

f)- La dégradation anaérobie partielle de molécules aromatiques, qui peut être réalisée par des souches individuelles, bien que la minéralisation complète nécessite la présence d'un consortium bactérien, de façon à maintenir l'équilibre énergétique.

II.- La dégradation anaérobie des polymères de lignine

Les déchets lignocellulosiques forment une proportion importante de la matière organique accumulée dans les sédiments marins et fluviaux. La lignine représente un composant importante du cycle du carbone, sa ré-incorporation doit forcément passer par une dépolymérisation soit par des mécanismes aérobie, soit par des réactions de réduction et rupture des liaisons inter-monomères en l'absence d'oxygène.

1.- Biodégradation anaérobie de lignine dans des environnements naturels

La lignocellulose marquée a été souvent utilisée comme substrat pour des expériences sur la biodégradation des lignines. Ainsi, FEDERLE et VESTAL (1980) ont signalé que les matériaux marqués suivant la méthode de CRAWFORD et al. (1978) sont utiles pour le suivi des métabolismes de lignine et cellulose dans des environnements naturels. Néanmoins, ils ont remarqué certaines limitations des lignocelluloses marquées, à savoir: la non-spécificité de l'incorporation du marquage qui pourrait amener à des surestimations du pourcentage de dégradation, le temps employé pour l'incorporation des composés marqués dans la lignine pourrait aussi affecter la nature de la lignine à étudier; ceci veut dire que si le temps de marquage est relativement court (24 h), le marquage est incorporé seulement dans la lignine récemment synthétisée, peu polymérisée qui pourrait être plus susceptible à l'attaque microbienne, et

qui donc serait minéralisée plus rapidement. Un autre facteur à considérer est la solubilité des composés marqués et leur transport ultérieur à l'intérieur des cellules microbiennes, ce qui pourrait aussi provoquer des erreurs dans l'estimation des pourcentages de biodégradation.

En résumé, la préparation de lignine marquée au ^{14}C *in vivo* ou *in vitro* (DHP) est aujourd'hui considérée comme la méthode de choix pour l'étude de la biodégradation de la lignine *in vitro*. Cependant, cette méthode, comme on l'a signalé plus haut, n'est pas discriminative. ODIER (1986) fait remarquer aussi la difficulté de comparer les résultats obtenus à partir de préparations différentes de lignine marquée au ^{14}C , suite à la carence de normalisation de ces méthodes.

Des lignines synthétiques marquées au ^{14}C (DHP) ont été utilisées pour étudier la récalcitrance de la lignine dans la nature [HACKETT *et al.*, 1977]. Des incubations aérobies et anaérobies ont été réalisées dans plusieurs environnements différents et avec des sédiments lacustres caractérisés microbiologiquement [ZEIKUS, 1977]. Aucune minéralisation de la lignine ^{14}C dans des conditions anaérobies n'a été observée. Toutefois, le dégagement de gaz (CO_2 et CH_4) produits du métabolisme anaérobie a été considéré comme indicatif de la présence d'une microflore active. La présence de nitrate inhibait la production du méthane [HACKETT *et al.*, 1977].

D'après ZEIKUS (1980) la lignine est dégradée lentement par des microorganismes aérobies, car elle constitue un plastique naturel qui serait plutôt érodé que catabolisé biologiquement en présence d'air et qui serait biologiquement inerte en absence d'oxygène moléculaire. Pour expliquer ces phénomènes, ZEIKUS (1980) considère d'abord la place de la lignine dans le cycle du carbone (Figure 22).

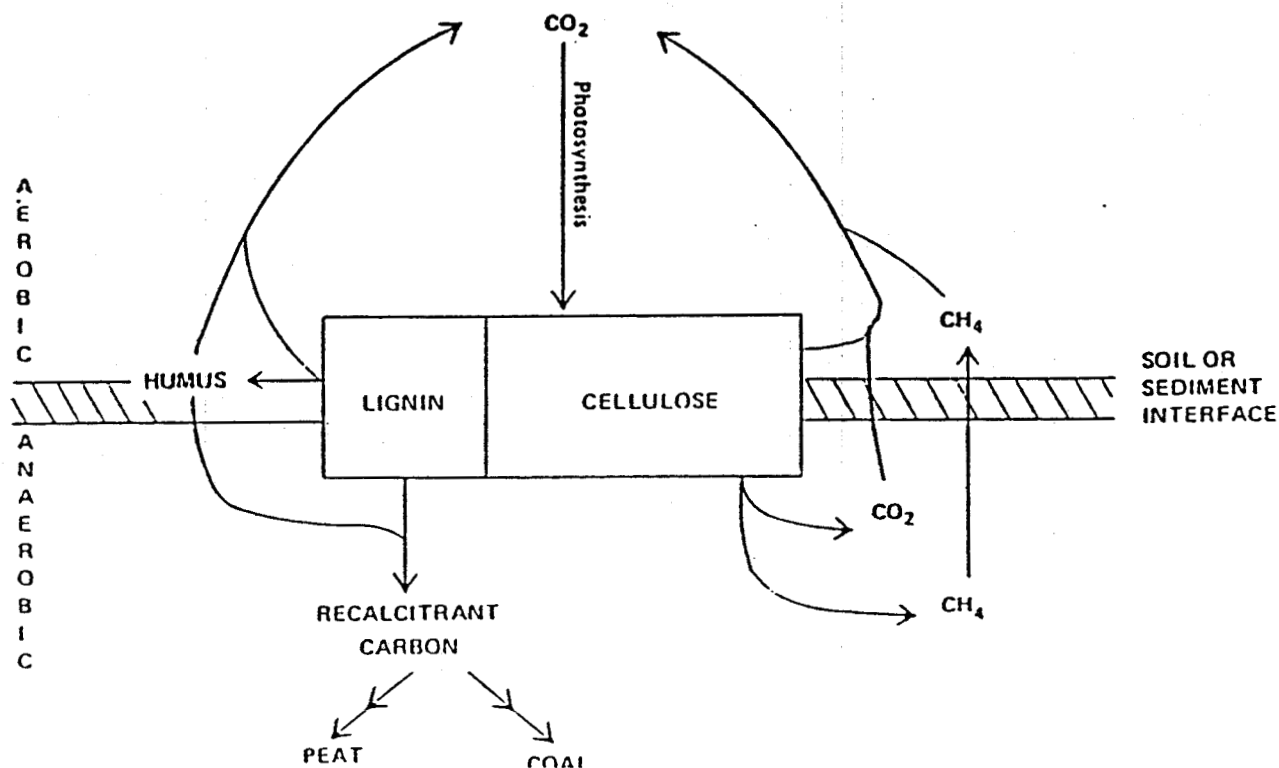


Fig. 22 : Place de la lignine dans le cycle du carbone

La lente minéralisation de la lignine en aérobie serait donc due à:

- 1) son rôle en tant que barrière pour la dégradation de la cellulose
- 2) son incapacité pour être utilisée en tant que source d'énergie par

les microorganismes

- 3) sa récalcitrance croissante pendant le processus d'humification.

En ce qui concerne la difficulté de dégradation de la lignine en anaérobie, ZEIKUS (1980) estime que les liaisons inter-monomères présentes dans la lignine ne sont pas attaquées par des enzymes hydrolytiques, et la présence d'une oxygénase serait donc nécessaire pour couper ce type de liaisons. Finalement, ZEIKUS conclut que puisque la lignine évolue dans une atmosphère riche en oxygène, sa synthèse demande de l'oxygène, donc sa dépolymérisation aussi, nécessite de l'oxygène moléculaire.

Cependant, dans une publication postérieure, ZEIKUS (1981) signale que: la présence des liaisons éther inter-monomères dans la lignine ne limite

pas sa biodégradabilité en anaérobiose. En revanche, il insiste sur l'influence du haut poids moléculaire moyen de la lignine et de son degré élevé de polymérisation sur sa dépolymérisation potentielle. En résumé, ZEIKUS considère que la lignine doit être modifiée chimiquement avant de pouvoir observer une dégradation significative dans des sédiments anoxiques.

Une évidence indirecte de la biodégradation anaérobie de la lignine a été fournie par AKIN (1976). Il a observé des microorganismes filamenteux du rumen, cultivés *in vivo* et *in vitro* sur des échantillons d'herbes. Les observations en microscopie électronique à balayage et à transmission, suggèrent que les bactéries (coques et bacilles) présentes, dégradent la paroi cellulaire des herbes et les cellules lignifiées du sclerenchyme. La proximité des microbes par rapport aux zones dégradées a été considérée comme un indice de la présence d'enzymes extracellulaires. Un rapport ultérieur d'AKIN (1980) signale la présence d'un microorganisme filamenteux anaérobie facultatif dans le jus de rumen; cet organisme pousse en tubes anaérobies sur des fragments herbacés (Bermuda grass). La morphologie de cette bactérie varie selon les conditions de culture. Les conditions optimales décrites pour cette bactérie sont 39°C et pH de 7,4 à 8. Le microorganisme était aussi capable d'utiliser des acides phénoliques (sinapique, férulique et p-coumarique) comme substrat de croissance. La microscopie électronique a été également employée dans cette étude. Cette même technique a été utilisée par HOLT et JONES (1983) pour démontrer l'attaque bactérienne sur des parois cellulaires de bois lignifié dans des habitats aquatiques anaérobies. La dégradation bactérienne superficielle était relativement rapide (3 mois). Néanmoins, elle n'était évidente que par l'observation microscopique, car les variations en poids des échantillons ont été considérée comme insignifiantes.

L'absence de dégradation de la lignine marquée au ¹⁴C en anaérobiose, a été signalée par plusieurs chercheurs [HACKETT et al., 1977 ; FEDERLE et

ESTAL, 1980 ; ODIER et MONTIES, 1983]. Cependant, en utilisant des méthodes plus sensibles et des préparations de ^{14}C lignocellulose non autoclavées, BENNER *et al.* (1984) ont démontré la biodégradabilité de ce type de matériel par des sédiments anoxiques.

Des matériaux lignocellulosiques marqués au ^{14}C ont été utilisés par BENNER *et al.* (1984) pour démontrer la dégradabilité de la lignine en anaérobiose. Après 294 jours d'incubation, 16,9 % de la lignine et 30 % des polysaccharides de la lignocellulose de *Spartina alterniflora* ont été dégradés en produits gazeux par la microflore des sédiments lacustres.

La lignine périphérique a été dégradée plus rapidement que celle de l'intérieur du substrat. En plus, la cellulose pure était minéralisée deux fois plus vite que le ^{14}C -polysaccharide des lignocelluloses dans des cultures des sédiments. BENNER *et al.* (1984) considèrent que la lignine forme une barrière contre la biodégradation anaérobie des polysaccharides liés physiquement et par covalence dans des lignocelluloses naturelles.

Des taux de dégradation des lignocelluloses marquées (^{14}C -lignines et ^{14}C -polysaccharides) par les microorganismes des sédiments anaérobies ont été déterminés par BENNER et HOBSON (1985a). Des taux de dégradation de 4,1% pour la lignine marquée et 12,2% pour les polysaccharides marquées ont été indiquées sur la partie hydrosoluble des substrats utilisés par ces auteurs. Malgré la présence de champignons dans leurs cultures, BENNER et HOBSON (1985a) ont affirmé que les bactéries sont les "dégradeurs" prédominants des lignocelluloses utilisées.

Des conditions thermophiles (55°C) ont permis de réduire le temps d'incubation pour la dégradation anaérobie des préparations lignocellulosiques marquées [BENNER et HOBSON, 1985b]. Les taux de dégradation

anaérobie à 55°C étaient 10 à 15 fois plus importants. En somme, BENNER et HOBSON (1985b) considèrent que dans des conditions thermophiles, la dégradation anaérobie des substrats contenant lignine marquée, dépend essentiellement de la taille des molécules et du degré de polymérisation. Ces auteurs rejoignent ZEIKUS (1980) en suggérant que l'attaque enzymatique sur la structure de la lignine du pin s'effectue sur la surface du polymère comme par un processus érosif.

2.- Dégradation de la lignine dans le rumen

La présence de lignine a été fréquemment citée comme un facteur limitant majeur dans la digestibilité des matériaux lignocellulosiques par les ruminants [WALDO et al., 1972 ; AKIN, 1982]. De ce fait, la lignine a été utilisée comme indice de digestibilité pour certains fourrages. [MORRISSON, 1979 ; BARTON et AKIN 1977]. Par ailleurs, selon REEVES (1984), la composition de la lignine joue aussi un rôle important dans la détermination de la digestibilité *in vitro*.

Afin d'observer l'effet de la délignification sur la digestibilité, BARTON II et AKIN (1977) ont réalisé des observations en microscopie électronique de balayage. Cette technique permet d'observer les cellules pariétales intactes avant et après le traitement chimique de délignification et la digestion *in vitro* par des microorganismes du rumen. Le traitement chimique améliorait le taux de digestibilité de tous les échantillons. Toutefois, l'association des polysaccharides de la paroi cellulaire avec la lignine et le degré de lignification devaient être aussi tenus en compte dans la détermination de la digestibilité des fourrages. MUNTIFERING (1982) met en question l'utilité de la lignine en tant que marqueur du digestat, étant donné sa dégradation partielle dans le tract gastrointestinal. Cette transformation avait été aussi signalée par FAHEY (1979). L'interaction entre les bactéries

du rumen et les parois végétales dépend du type de bactéries et du type de fibre, ainsi que de la lignification. Ceci a été démontré par l'effet de disruption des parois par addition de KOH. Une augmentation importante de la digestibilité a été observée grâce à une forte interaction plante/microorganisme [SPENCER et AKIN, 1980].

La présence de liaisons entre les hémicelluloses et la lignine a été signalée comme la raison pour laquelle ces carbohydrates présentent une digestibilité ruminale moins importante que les celluloses [MORRISON, 1979]. Une augmentation de la digestibilité *in vitro* de la fibre crue a été associée à la réduction de taille par broyage. Cette opération pourrait apparemment rompre les liaisons hémicellulose-lignine [PIGDEN et HEANEY, 1969]. Des auteurs comme MERTENS (1977) et BARTON et AKIN (1977) considèrent que des facteurs autres que la lignine doit être tenus en compte dans la détermination de digestibilité des matériaux lignocellulosiques. Ainsi, ils citent des caractéristiques anatomiques et la localisation et l'extension de la lignification.

Par ailleurs, CHANDLER *et al.*, (1980) ont démontré la linéarité entre le contenu de lignine et la réduction des matières solides volatiles dans leur étude sur la biodégradabilité de plusieurs espèces végétales. Parmi les équations proposées par CHANDLER (1980), l'équation suivante apparait comme la plus appropriée pour la prédiction de la biodégradabilité d'un matériel lignocellulosique quelconque :

$$B = -0,29 X + 0,83$$

où X = contenu de lignine (%) des matières solides volatiles

Pour l'établissement de cette équation la lignine a été dosée gravimétriquement.

CHYNOWETH et JERGER (1985) mettent en question la validité de l'équation de CHANDLER (1980). Ils estiment que l'association entre la lignine et autres polymères de la paroi cellulaire ne seraient pas aussi gênante pour l'attaque enzymatique microbienne, malgré la résistance de la lignine à cette attaque.

Le rôle des champignons anaérobies du rumen dans le métabolisme des fibres lignocellulosiques a fait l'objet du travail de plusieurs chercheurs [BAUCHOP, 1979, 1981; ORPIN et LETCHER, 1979]. Ces auteurs ont montré que les champignons du rumen possèdent une activité cellulolytique intense et colonisent essentiellement les fragments des plantes fibreuses. La participation de ces microorganismes à la dégradation anaérobie de la lignine a été étudiée par WINDHAM et AKIN (1984) et AKIN (1983) qui ont conclu que les bactéries du rumen étaient les plus actives dégradatrices de fibres, car malgré un développement sporangial important, le champignon du rumen ne dégrade pas la lignine ou les tissus lignifiés.

3.- Dépolymérisation anaérobie des oligolignols

Des oligomères de lignine (PM < 1500) marquée au ^{14}C ont été transformés en anaérobiose par des cultures inoculées à partir d'un digesteur anaérobie mésophile. [COLBERG et YOUNG, 1982]. Les fragments de lignine ont été obtenus suite au traitement thermo-alkalin (400 méq de NaOH/l et 1 h en autoclave à 200°C). Des modifications dans la distribution de poids par chromatographie sur gel sont observées après 30 jours d'incubation. Un déplacement vers des molécules de taille moléculaire moins élevée a été observé. De 13 à 18% de l'activité initiale du ^{14}C a été retrouvée dans le $^{14}\text{CO}_2$ et le $^{14}\text{CH}_4$. La dégradation du substrat est incomplète, cependant, les résultats obtenus par COLBERG et YOUNG (1982) suggèrent la possibilité que les polymères dérivés de la lignine puissent être catabolisés en anaérobiose par

une population bactérienne mixte.

Une expérience récente, utilisant séparément des fractions oligomères de lignine marquée obtenues par chromatographie sur gel a été réalisée par COLBERG et YOUNG (1985a). Ils ont mis en évidence la minéralisation en CO_2 et CH_4 de 21% de la fraction de PM 1000 à 1400, 32% de la fraction de PM 400 à 1000, et 40% de la fraction dont le PM est < 400 . La spécificité et l'efficacité du marquage (67%) dans la fraction lignine du bois, la caractérisation du substrat (absence de sucres), et le pourcentage de récupération de ^{14}C dans le $^{14}\text{CO}_2$ et le $^{14}\text{CH}_4$ pour les différentes fractions ont été signalées comme une preuve de l'utilisation de lignine comme source de carbone. La publication de COLBERG et YOUNG (1985a) souligne la relation inverse entre la biodégradabilité en anaérobiose de la lignine et la taille des molécules.

Afin d'identifier les composés intermédiaires de la dégradation anaérobie des dérivés de lignine, des cultures d'enrichissement ont été réalisées sur substrat marquée au ^{14}C (poids moléculaire 600). Ce substrat était employé comme seule source de carbone. L'inhibition de la méthanogénèse par addition de BESA favorisait l'accumulation dans le milieu d'acides gras volatils, essentiellement l'acétate. D'autre part, presque la moitié du carbone du substrat original était catabolisé et transformé en monomères aromatiques, tel que les acides cinnanique, benzoïques, caféique, vanillique et férulique. [COLBERG et YOUNG, 1985b]. Ces résultats montrent la possibilité de l'existence de mécanismes de rupture des liaisons inter-monomères de la lignine dans des conditions anoxiques (Figure 23, page 64).

Deux composés synthétiques modèles de la lignine, le vératrylglycérol- β -guaiacyl éther (VGE) et l'acide guaiacoxycétique (AGA) ont été employés par CHEN *et al.* (1985) pour démontrer la rupture complète en

anaérobiose des liaisons inter-monomères du type β -aryléther. Une population bactérienne mixte isolée du rumen a été cultivée dans des conditions de stricte anaérobiose dans un milieu d'extrait de levure contenant de 0,2 à 0,5 g/l de VGE et d'AGA. Après 4 jours d'incubation à 37°C, 90% du VGE a été dégradé. La dégradation de l'AGA a atteint 70% dans une période de 12 heures et de 100% après 36 heures. Le schéma probable des réactions impliquées dans le métabolisme de ces composés, est indiqué à la Figure 24 (page 64).

CHEN *et al.* (1985) suggèrent que la dégradation du VGE via l'AGA en phénol commence par une possible rupture de la liaison $C\alpha-C\beta$ qui résulte en la formation de 2-(*o*-méthoxyphénoxy)éthanol et vanilline. Ces deux composés sont par la suite dégradés par une possible oxydation des groupements alcool du 2(*o*-méthoxyphénoxy)éthanol et du groupement aldéhyde de la vanilline, en AGA et acide vanillique. Deux voies possibles pour la dégradation de l'AGA sont schématisées: lorsque la rupture de la liaison β -aryléther se produit la première, l'AGA est transformé en guaiacol, lequel est ensuite déméthoxylé en position ortho pour donner le phénol; ou bien, la déméthoxylation se produit avant la rupture de la liaison β -aryléther donnant lieu à la formation de l'acide phénoxyacétique et puis au phénol, lequel peut être réduit ultérieurement via la cyclohexanone [EVANS, 1977]. Par ailleurs, CHEN *et al.* (1985) considèrent que le guaiacol est déméthylé d'abord pour former le catéchol et ensuite il entre la voie oxydative proposée par CRAWFORD et CRAWFORD (1980).

CONCLUSIONS

La complexité structurale et non la composition de la lignine apparait comme la limitation principale pour sa biodégradation. Que ce soit en

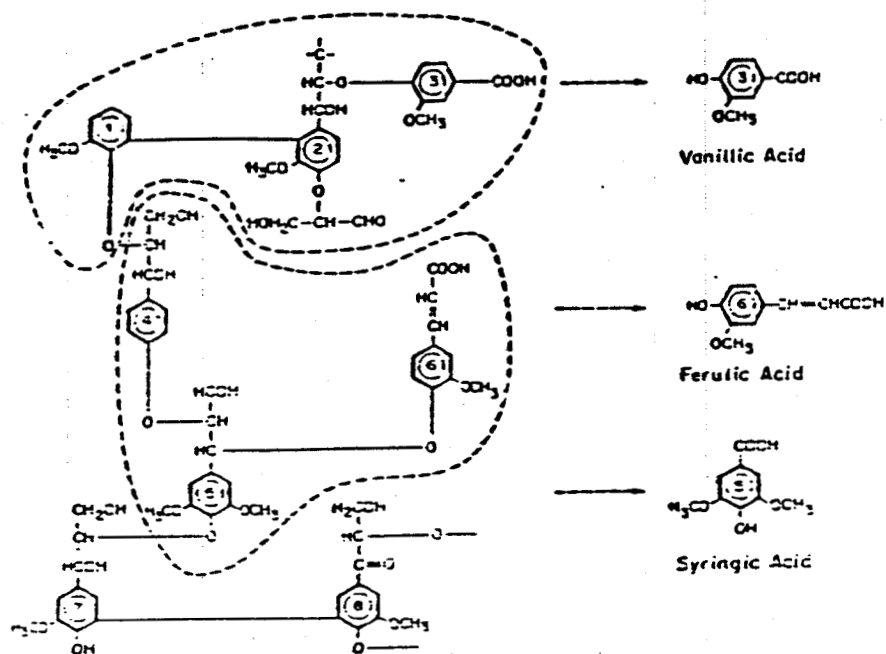


Fig. 23 : Dégradation des oligolignols en anaérobiose (COLBERG et YOUNG, 1985b)

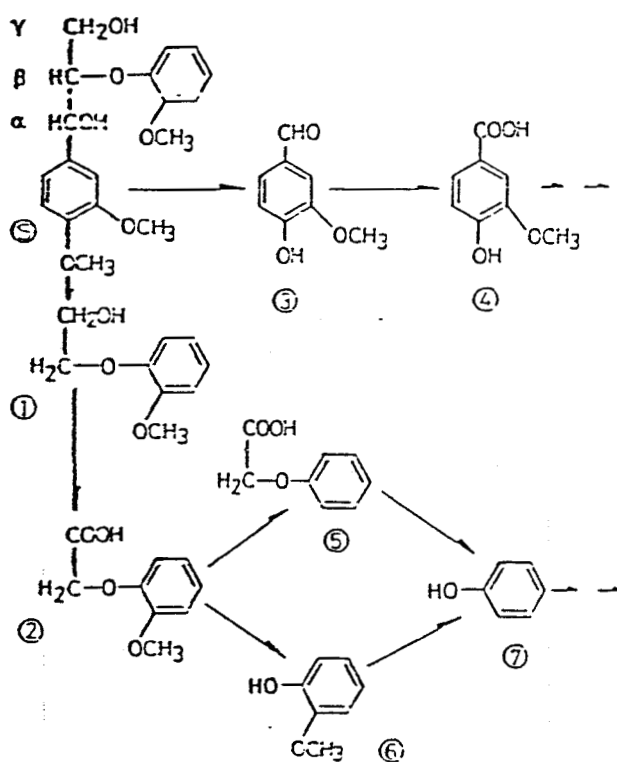


Fig. 24 : Dégradation de l'AGA en anaérobiose (CHEN et al., 1985)



aérobiose ou en absence de l'oxygène, les microorganismes ne dégradent pas complètement ce polymère dans la nature. Cependant, les lignines modifiées issues des opérations industrielles, telles que la lignine KRAFT pourraient être plus susceptibles aux attaques bactériennes, même en anaérobiose. Les cultures mixtes s'avèrent indispensables à l'utilisation des lignines comme substrats carbonés, étant donné le bilan thermodynamique défavorable des réactions de dépolymérisation.

La technologie pour la dégradation de la lignine par des champignons est en cours de développement. La connaissance des mécanismes biochimiques et des conditions optimales de culture est pourtant incomplète et la rentabilité commerciale encore lointaine.

D'autre part, le manque d'oxygène n'empêche pas l'utilisation partielle de la lignine, ainsi que l'ont démontré plusieurs chercheurs. Néanmoins, le faible taux de dégradation rapporté illustre les difficultés rencontrées lors de ces expériences. A ceci s'ajoute la longue période d'adaptation nécessaire avant de pouvoir observer des variations dans des paramètres expérimentaux.

Les objectifs de la présente étude sont de contribuer à la connaissance des conditions de culture des bactéries anaérobies susceptibles d'utiliser et éventuellement de dépolymériser les lignines modifiées de différentes sources. On n'a pas cherché à établir la biodégradabilité en anaérobiose de la lignine naturelle (protolignine) mais à montrer surtout la capacité d'adaptation des microorganismes anaérobies aux substrats qui contiennent des oligomères, polymères dérivés de lignine.

MATERIEL ET METHODES

DESCRIPTION DES MATIERES PREMIERES

Les matières premières pour l'obtention des lignines utilisées pour cette étude sont la paille de blé et la sciure de peuplier. Ces deux matériaux ont été choisis car ils sont souvent employés dans des expériences sur la biodégradation de la lignine ou de la lignocellulose.

Par ailleurs, les méthodes d'extraction de lignine décrites plus loin ne sont pas des méthodes destinées à produire une lignine non modifiée (à l'exception de l'extraction au dioxane) mais surtout à obtenir des lignines qui ressemblent à celles générées comme sous-produits de certains processus industriels.

La lignine commerciale de pin, Indulin-AT (Marque déposée de la Westvaco Corp., Charleston, N.C., U.S.A.) a été employée comme lignine de référence.

METHODES D'EXTRACTION DE LA LIGNINE

A.- Extraction avec la liqueur Kraft [CRAWFORD *et al.*, 1977].

Les matériaux lignocellulosiques (paille de blé et sciure de peuplier) sont broyés dans un broyeur Forplex type F00. Ensuite une quantité connue du matériel est mélangée à la liqueur KRAFT (NaOH 1,38 M et Na₂S 0,25 M dans l'eau distillée) dans un flacon hermétique. La proportion liqueur-substrat est de 10:1 (v/p). Le mélange substrat-liqueur est autoclavé à 120 °C pendant 3 heures. Après le traitement, la "liqueur noire" est centrifugée et filtrée avant d'être acidifiée jusqu'à pH 1 à 2 avec H₂SO₄. A cette valeur de pH la lignine précipite et peut être séparée par centrifugation. La lignine précipitée est lavée au moins deux fois avec l'eau distillée afin de neutraliser partiellement l'acidité et d'éliminer les sucres solubles. Finalement, la préparation est lyophilisée pour être pesée et utilisée par la suite dans des essais de dégradation.

B.- Extraction thermique-alkaline à la soude [HASHIMOTO, 1986]

Une quantité connue de paille de blé ou de sciure broyée (0,8 mm) est mélangée avec une solution de NaOH de façon à obtenir une proportion de 60 mg de NaOH/g M.S. La suspension est autoclavée (1 heure à 120°) dans un flacon hermétique. Ensuite, la lignine solubilisée est séparée par centrifugation (10 min. à 10.000 RPM) et précipitée par acidification (pH 1 à 2) et lavée à l'eau distillée avant d'être lyophilisée.

C.- Extraction au dioxane

A une quantité connue du matériel lignocellulosique broyé (tamis 0,25

mm) dans un flacon à vis, on ajoute une solution dioxane-eau (90:10 V/V) dans la proportion 10:1 (V/P) par rapport au matériel.

On extrait sous agitation pendant 72 h à température ambiante, on filtre ou centrifuge, et récupère le surnageant. Après évaporation du solvant sous vide, on sèche et pèse le résidu.

La lignine ainsi obtenue a été purifiée par la suite par dialyse pendant 16 heures.

METHODES D'ANALYSE

A.- Matières sèches

Une quantité connue d'échantillon est séchée à 105°C jusqu'à poids constant. Les résultats sont exprimés en pourcentage (P/P) de l'échantillon.

B.- Matières minérales

L'échantillon séché à 105°C est calciné au four à 550°C. Le résidu correspond à la fraction minérale et les matières volatiles (pertes au four) représentent la matière organique. Les résultats sont exprimés en pourcentage (P/P) de la matière sèche.

C.- Azote total organique

L'azote total est déterminé par la méthode KJELDAHL et les résultats sont exprimés en pourcentage (P/P) de la matière sèche.

D.- Fibres végétales

Les différents composants fibreux des matériaux lignocellulosiques ont été fractionnés et dosés suivant la méthode de GOERING et VAN SOEST (1970).

E.- Dosage de gravimétrique de la lignine

Mise à part la détermination de la lignine en tant que résidu du dosage de fibre détergente acide [GOERING et VAN SOEST, 1970], la lignine a été aussi déterminée par la méthode de KLASON suivant la modification de

TANAKA *et al.* (1985). Dans un bécher de 50 ml, on pèse 0,001 g à 1 g de l'échantillon sec extrait à l'alcool-benzène. On ajoute à la pipette 30 ml de H₂SO₄ à 72% (P/P) en mélangeant bien et en écrasant les fibres avec une tige de verre à bout aplati.

On laisse ensuite reposer 2 heures à 20°C avec agitation intermittente. On dilue alors dans un flacon d'un litre avec de l'eau distillée, pour réduire la concentration de H₂SO₄ à 4% (P/P). On porte à ébullition sous réfrigérant à reflux pendant 4 heures.

On filtre à travers un creuset en verre G4 préalablement taré. On rince soigneusement à l'eau distillée jusqu'à neutralité. Après séchage à l'étuve à 105°C, le creuset contenant le résidu est pesé.

(Creuset plus résidu - Creuset vide) x 100

Lignine % = -----

Prise d'essai anhydre

PURIFICATION DE LA LIGNINE

Les lignines obtenues par la méthode KRAFT ont été débarassées des polyosides en suivant la procédure décrite par LUNDQUIST (1975, 1977, 1980).

Le schéma général de la purification est indiqué à la Figure 25 (page 72).

TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

A.-Composition du milieu de culture

La composition du milieu de culture apparaît dans le Tableau 2 (page 73). La préparation du milieu a été effectuée suivant la méthode décrite par TOUZEL et ALBAGNAC (1983). Des modifications ont été réalisées au cours des expériences et elles sont indiquées dans chacun des cas décrits. Les concentrations de lignine employées dans les expériences initiales ont été choisies d'après celles indiquées dans la littérature pour des expériences semblables [HEALY et YOUNG, 1978, 1979 ; ODIER *et al.*, 1981 ; COLBERG et YOUNG, 1985]. Le même critère a été employé pour la sélection des pH [HEALY et YOUNG, 1980 ; SCHLOMI *et al.*, 1978 ; AKIN, 1980 ; ODIER et MONTIES, 1983].

B.- Suivi des cultures

En général, on a utilisé des flacons de 150 ml avec bouchon de caoutchouc. Un volume de 100 ml de milieu liquide de culture permet d'avoir 50 ml d'une atmosphère anaérobie dans les flacons. L'atmosphère anaérobie à l'intérieur des flacons était produite par barbotage d'un mélange $N_2:CO_2$,

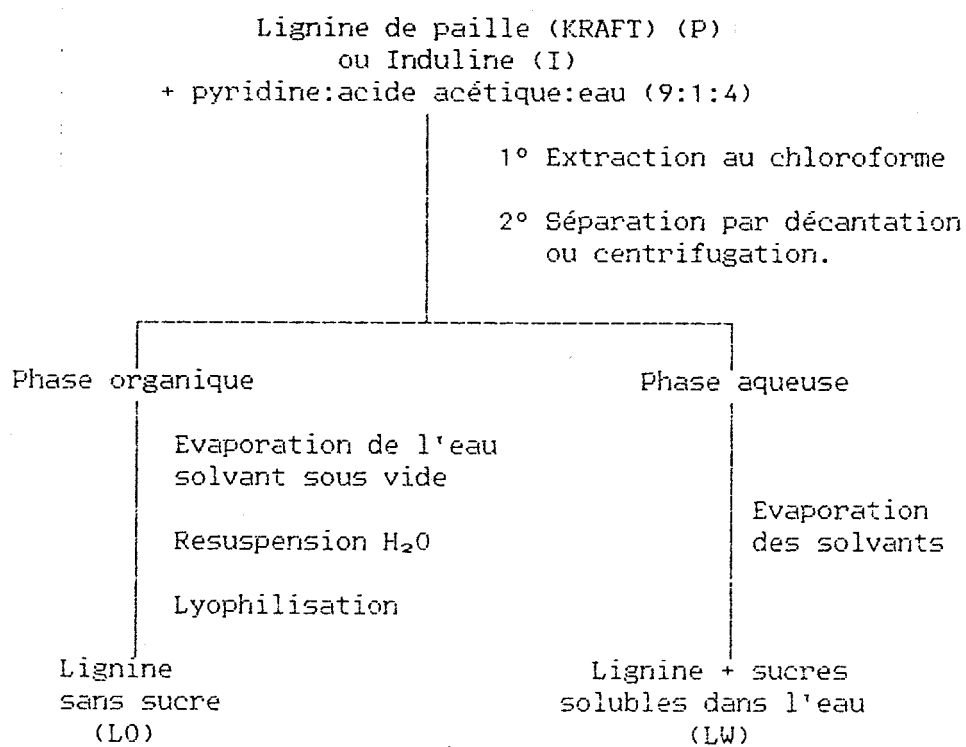


Fig. 25 : Schéma de purification de la lignine selon LUNQUIST et KIRK (1977)

Tableau 2 Composition du milieu de base BC (pour 100 ml):

H ₂ O Milli-Q	89 ml
Sol. macrominérale (1)	5 ml
Sol. vitamines concentrée (2)	0,1 ml
NH ₄ Cl	0,1 g
Résazurine à 0,2 %	0,1 ml
HEPES (3)	1,191 g
KHCO ₃	0,99 g
Cystéine-sulfure (4)	2,00 ml

 (1) Sol. macrominérale (pour 100 ml)

KH ₂ PO ₄	0,6 g
NaCl	1,2 g
MgCl ₂ .6 H ₂ O	0,24 g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,16 g

(2) Sol. vitamines concentrée (pour 100 ml)

Biotine	0,2 mg
Acide folique	0,2 mg
Pyridoxine, HCl	1,0 mg
Thiamine, HCl	0,5 mg
Riboflavine	0,5 mg
Acide nicotinique	0,5 mg
DL-calcium pantothénate	0,5 mg
Vitamine B ₁₂	0,01 mg
Acide p-aminobenzoïque	0,5 mg
Acide lipoïque	0,5 mg

(3) HEPES = acide [4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine-éthane sulfonique

(4) Cystéine-sulfure (pour 100 ml):

Cystéine, HCl	1,24 g
Na ₂ S, 9 H ₂ O	1,24 g



85/15 (V/V) pendant au moins 10 minutes.

Pour le suivi des incubations, nous avons mesuré la production de gaz dans les flacons. D'autre part, des échantillons du liquide de culture ont été prélevés périodiquement pour analyses.

Le schéma de la Figure 26 (page 75) montre la séquence employée pour le prélèvement des échantillons liquides.

Pour certains essais, un fractionnement des échantillons liquides a été réalisé afin de séparer les composés phénoliques selon JOKELA *et al.* (1985), en vue de leur analyse ultérieure (Figure 27, page 76).

I.- Dosage des acides gras volatils

Les acides gras volatils (AGV) 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 Mesh imprégné à 25% de NPGA (néopentyl glycol adipate) et de 2% d'acide phosphorique.

- gaz vecteur N₂, saturé en acide formique (débit 30 ml min."")

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

- température de la colonne: 150°C.

- injection automatique (1,0 µl). La quantification se fait par la méthode d'étalonnage externe.

II.- Analyse des gaz de fermentation

Un volume déterminé de gaz sous pression est prélevé à l'aide d'une

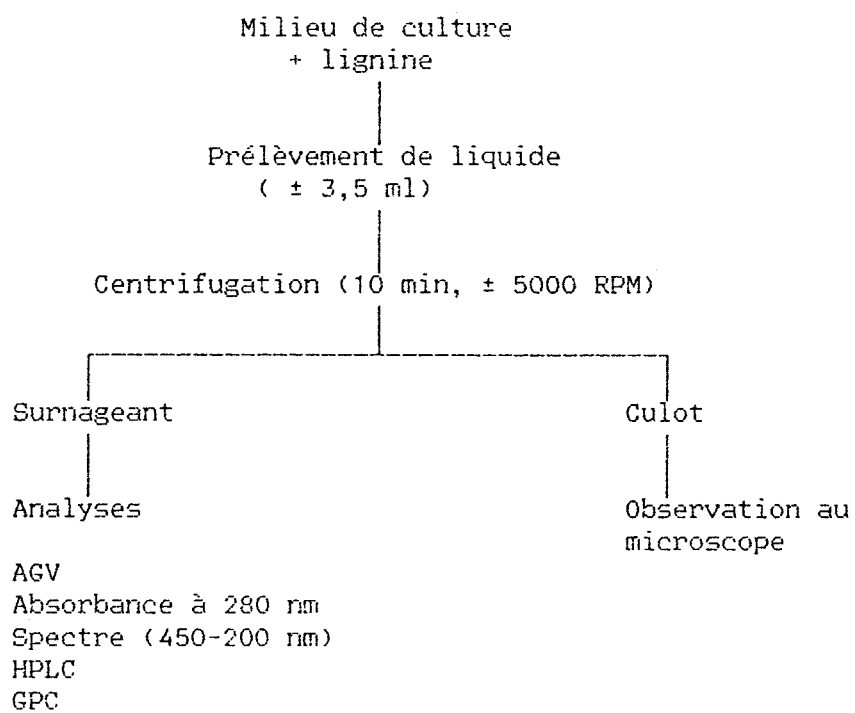


Fig. 26 : Schéma de traitement des échantillons prélevés

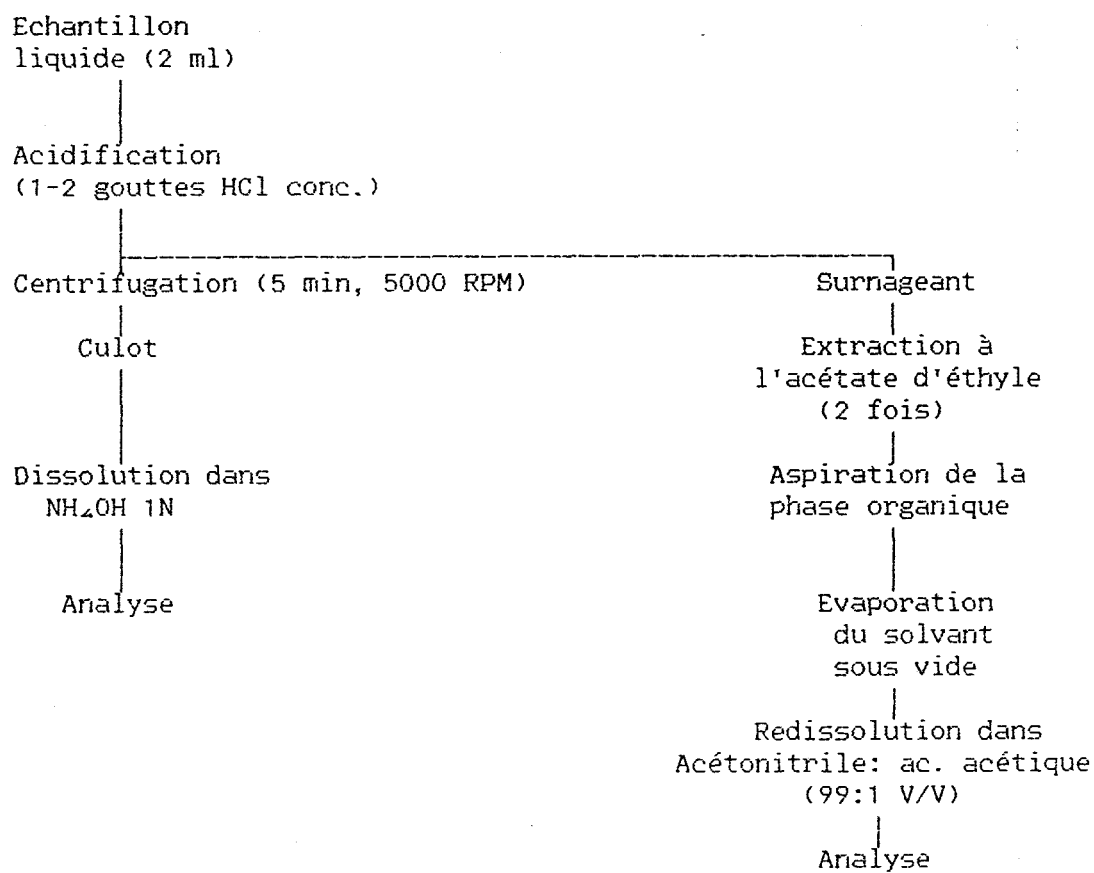


Fig. 27 : Schéma de fractionnement des échantillons liquides selon JOKELA et al. (1985)

seringue étanche au gaz, munie d'une vanne d'arrêt. L'injection directe dans un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un intégrateur de type Shimadzu CR-3A permet une analyse qualitative quantitative par corrélation directe avec une courbe d'étalonnage (surface en fonction de la quantité de méthane injectée).

Chromatographe: Intersmat IGC 11

Détecteur à conductivité thermique

Gaz vecteur: Hélium, 2 bars, 50 ml/min pour la séparation de N_2 , CH_4 et CO_2 .

Colonne: acier inox 3 m x 4 mm remplie de Porapak S.

Température de colonne: 50°C

Température de l'injecteur: 60°C

Température du détecteur: 100°C

Volume d'injection: 1 ml. Le calcul des concentrations est fait par la méthode de l'étalonnage externe avec un intégrateur Shimadzu.

Les résultats sont exprimés en ml de gaz pur à la pression atmosphérique et à 20°C par ml d'échantillon gazeux prélevé sous pression.

III.- Analyse de composés phénoliques par chromatographie liquide haute performance

L'appareil utilisé était un système modulaire Waters muni :

- d'un injecteur automatique WISP
- de deux pompes 6000 A couplées à un programmeur de gradient M660
- d'un système de colonne à compression radiale RCS
- d'un détecteur U.V.-visible à variation continue de longueur d'onde

modèle M450.

La séparation des composés phénoliques a été effectuée sur une colonne en phase inverse waters de C18 (10 μ). Les échantillons prélevés des flacons d'incubation étaient injectés directement dans le système après centrifugation, ou bien après extraction par l'acétate d'éthyle (2 fois), évaporation du solvant et redissolution dans un solvant approprié [JOKELA *et al.*, 1985].

La phase mobile pour la séparation est composée des solutions A [méthanol-eau 50:50 (V/V)] et B [acide acétique-eau 10:90 (V/V)]. Les solutions A et B sont pompées isocraquement en proportions 50-50. La longueur d'onde de détection est de 280 nm. Des solutions des acides phénoliques purs ont été utilisés comme étalons. [Waters, Technical Bull. 82504/L01/1981].

IV.- Dosage des sucres totaux

Pour l'analyse des résidus d'oses attachés aux lignines, deux méthodes ont été utilisées :

- le dosage au phénol-acide sulfurique [DUBOIS *et al.*, 1956]
 - le dosage à l'antrone-acide sulfurique avec un analyseur Technicon [LOEWUS, 1952].
- L'extraction des sucres a été réalisée suivant la méthode de TOLLNER et HILL (1981).

V.- Chromatographie de perméation sur gel

La séparation des constituants des lignines a été réalisée par tamisage moléculaire sur un gel Séphadex G-25 super fin, dont la limite d'exclusion est 5000. La solution d'élution est l'ammoniaque 0,1 N, pH 10,3. Les dimensions de la colonne sont 40 x 1,5 cm avec un débit de 0,53 ml/mn.

Les échantillons sont déposés sur le gel et les éluats sont détectés

grâce à un détecteur pharmacia P-1 de longueur d'onde fixée à 280 nm.

Le Bleu Dextran 2000 a été utilisé pour déterminer le volume d'exclusion.

VI.- Observations au microscope

Les cultures ont été observées en microscopie optique à l'état frais ou après fixation dans une goutte de gélose 1% contenant 4% de glutaraldéhyde.

VII.- Analyse par résonance magnétique (RMN)

Les spectres de carbone ^{13}C ont été réalisés avec un appareil de type BRUKER AM 300 fonctionnant à 75,468 MHz en mode T.F. au Centre Grenoblois de Résonance Magnétique.

Les protons étaient dicouplés et 3000 à 12000 passages étaient accumulés. Les échantillons étaient en solution à la concentration de 5 à 10% dans le diméthylsulfoxyde- d_6 (DMSO- d_6) en tubes de 10 mm de diamètre. Le tétraméthylsilane (TMS) était employé comme référence. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm (parties par million) par rapport à la référence interne (TMS). Les temps d'attente sont de 2,5 s.

RESULTATS

ANALYSE DES MATIERES PREMIERES ET OBTENTION DES LIGNINES

Les lignines utilisées pour notre travail ont été extraites de matériaux lignocellulosiques (dont la composition est détaillée au Tableau 3, page 81), tels que la paille de blé et la sciure de peuplier. La lignine a été séparée des autres composants (cellulose et hémicelluloses) par solubilisation, soit dans la soude, soit dans la liqueur KRAFT, suivant les procédés décrits précédemment.

Il est important de signaler que les lignines ainsi obtenues ne sont pas des "protolignines" ou lignines non modifiées, mais des résidus d'extraction de type industriel. Cela signifie qu'à côté de la lignine, composé prépondérant, d'autres constituants tels qu'acides phénoliques et hémicelluloses, font aussi partie des substrats que nous dénommerons "lignines" par commodité. Cependant nous avons considéré que ceci ne diminuait pas l'intérêt du sujet, car c'est plutôt ce type de résidus, et non les protolignines (ou lignines naturelles), qui posent des problèmes de pollution par leur accumulation ou par leur potentielle nuisance pour l'environnement. D'autre part, très peu de travaux ont été publiés qui fournissent des renseignements sur la biodégradabilité, et à plus forte raison les mécanismes, de ces matériaux en anaérobiose.

Les compositions des matières premières et les résultats d'analyse des lignines sont présentés aux Tableaux 3, 4 et 5 (pages 81 et 82) et à la Figure 28 (page 82).

Tableau 3: Composition des matières premières avant et après l'extraction de la lignine

Type	Réactif extract.	M.S. (%)	Miné- raux (%)	N total (%)	Cellu- lose (%)	Hémicel- luloses (%)	Lignine (%)	M.V. (%)
Avant extraction de la lignine								
Paille blé	-	98,3	7,2	,6	41,3	28,7	6,7	91,1
Sciure peuplier	-	98,8	1,4	,1	56,8	25	13,9	97,4
Après extraction de la lignine								
Paille blé	(¹)	74,5	36,1	n.d.	36,2	7,6	,07	38,4
Sciure peuplier	(¹)	97,6	26,8	n.d.	48	8,6	7	70,8
Paille blé	(²)	90,4	6,7	n.d.	47,6	22,8	9,2	83,7
Sciure peuplier	(²)	98,7	3,1	n.d.	55,9	19,5	14,9	95,6

(¹) Liqueur Kraft

(²) NaOH 60 mg/g M.O.

Tableau 4 : Teneur des extraits en lignine (Klason) et en sucres totaux (anthrone)

Type d'échantillon	Lignine (% en poids)	Sucres totaux (% en poids)
Lignine KRAFT de paille	28,4	8,4
Extrait lignine KRAFT de paille	60,2	9,7
Induline Westvaco	32,3	1
Extrait d'Induline Westvaco	76,2	0



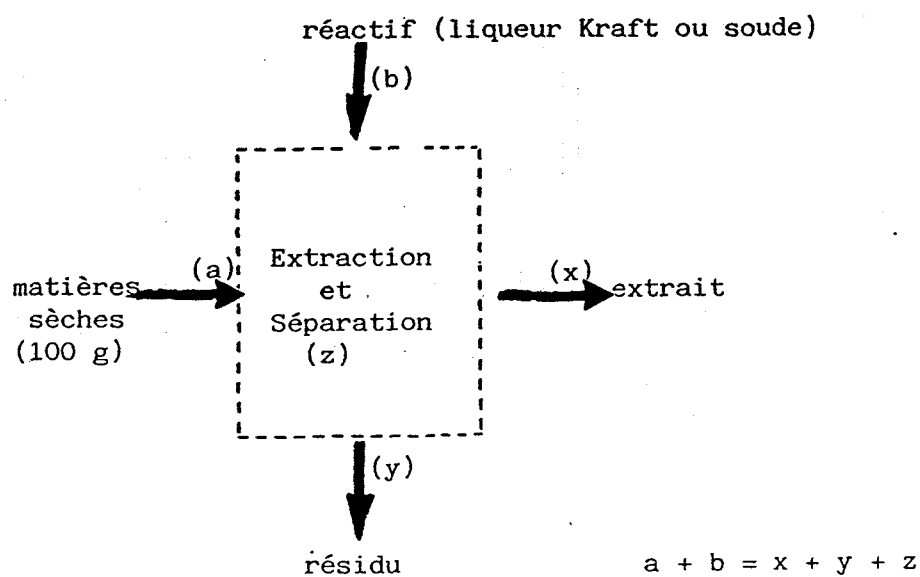


Fig. 28 : *Bilan des matières pour les procédures d'extraction*

Tableau 5 : *Bilan de matière pour les procédures d'extraction*

Matière première	Méthode d'extraction	x	y	a	b	z
Paille	Kraft	8,7	74,5	100	74,7	91,5
Sciure	Kraft	5	97,6	100	74,7	72,1
Paille	Soude (*)	7,9	86	100	4	10,1
Sciure	Soude (*)	3,9	93,7	100	4	6,4

SCHEMA GENERAL DES EXPERIENCES REALISEES

Etant donné l'expérience de la station de Technologie Alimentaire de l'INRA pour la culture des bactéries anaérobies, nous avons considéré que les méthodes microbiologiques devaient être celles utilisées dans ce laboratoire sous réserve de modifications éventuelles en fonction du déroulement des essais. Ainsi, le milieu de culture, dont la composition est indiquée dans le chapitre précédent, a été décrit par TOUZEL et ALBAGNAC (1983). Des flacons hermétiques de 150 ml contenant 100 ml de milieu, ont été employés dans la majorité des essais, sauf dans les cultures d'enrichissement (500 ml) et les essais Va et X.

L'inoculum bactérien du départ provenait d'un digesteur anaérobie qui méthanisait des résidus lignocellulosiques de contenu de panse de bovins. Ultérieurement, les inoculations ont été effectuées en prélevant en anaérobiose une partie de la culture en cours. On choisissait de repiquer ceux dont la variation des paramètres de suivi et donc la dégradation étaient plus importante.

Les concentrations des lignines employées dans le premier essai étaient établis sur la base de celles utilisées dans des études du même type [ODIER *et al.*, 1981 ; HEALY et YOUNG, 1979 et COLBERG et YOUNG, 1985]. Par ailleurs, les valeurs de pH choisies (pH 7 et 8) ont été celles qu'on trouve dans la littérature. Les conditions thermophiles avaient été utilisées par BENNER et HODSON (1985b) dans une étude similaire.

A.- Résumé des différentes étapes de culture microbienne

Une série d'expériences a été réalisée afin de définir les bonnes

Digesteur

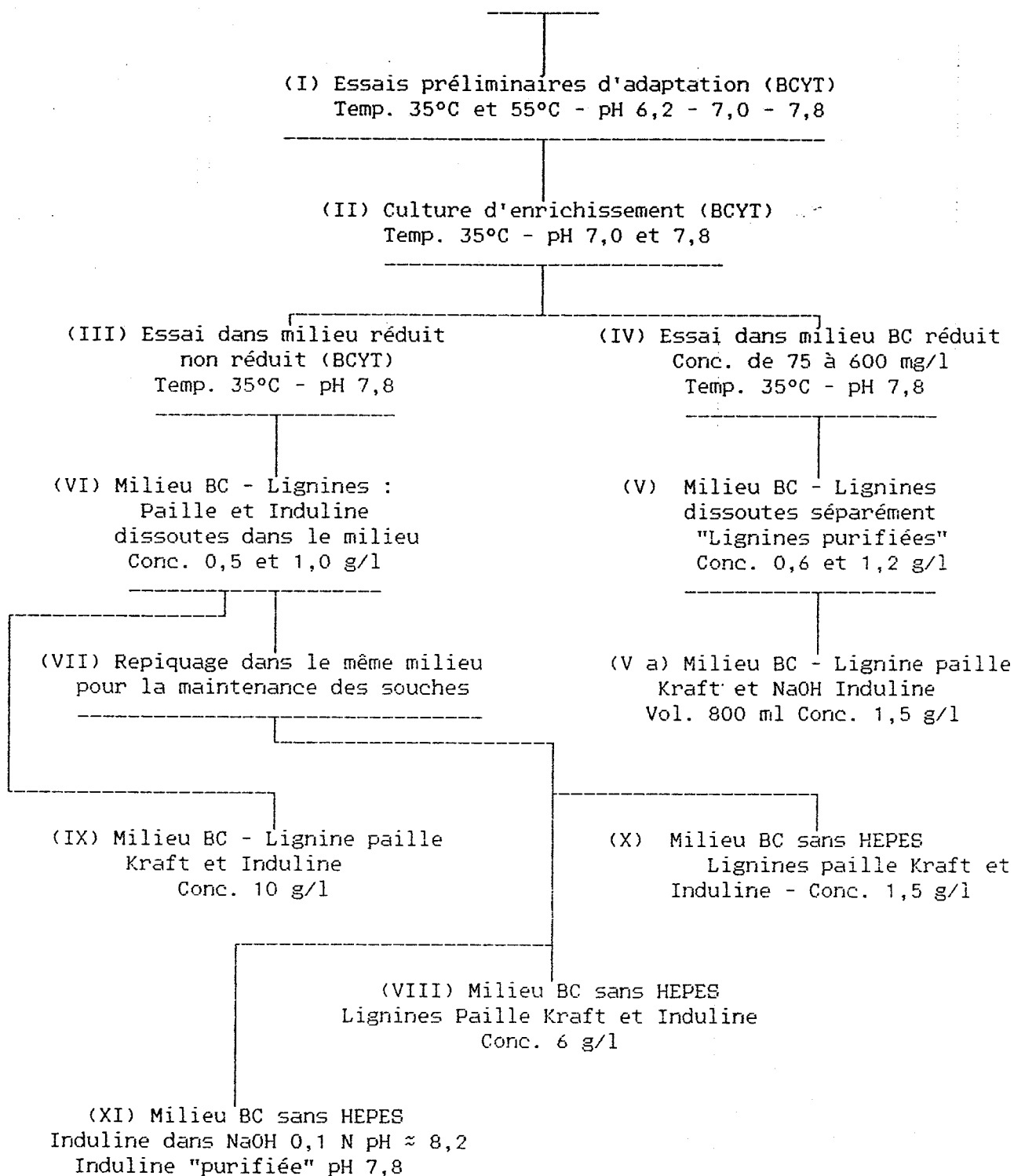


Fig. 29 : Sélection des conditions de culture pour la mise en évidence de la biodégradation)

conditions de culture pour les microorganismes qui utilisaient la lignine comme substrat carboné. La séquence des expériences effectuées apparaît dans le schéma de la Figure 29 (page 84) dans lequel ont été indiqués, pour chaque expérience, les paramètres qui ont subi une variation par rapport aux conditions des essais précédents. Les différents étapes du schéma sont détaillées dans ce qui suit :

ETAPE I :

Dans cet essai préliminaire, les variables ont été:

- les substrats: lignines KRAFT de paille de blé et de sciure de peuplier, lignines extraites avec NaOH de paille de blé et de sciure de peuplier. Concentration : 0,3 g/l.
- les températures: mésophile (35°C) et termophile (55°C)
- le pH: acide (6,2), neutre (7,0) et basique (7,8)

Temps d'incubation moyen: 180 jours.

L'inoculation s'est faite à 5% V/V.

ETAPE II :

L'inoculation pour les cultures d'enrichissement provenait des flacons ayant montré les variations analytiques les plus importantes. Les conditions d'incubation pour ces essais ont été aussi dérivés de ces flacons dont la meilleure croissance (par rapport aux paramètres analytiques) a été observée, ces conditions étaient :

Substrats: Lignines Kraft et soude de paille et de peuplier

Température: mésophile: 35 °C

pH: neutre (7,0) et alcalin (7,8).

La composition du milieu était la même dans les deux cas, les flacons d'incubation contenaient 500 ml du milieu.

Les cultures d'enrichissement ont fourni la biomasse nécessaire pour les expériences suivantes.

ETAPE III :

L'apparente nécessité d'oxygène pour la biodégradation des lignines a été parfois signalée (SALKINOJA-SALONEN, communication personnelle). C'est pour cela qu'un essai de dégradation a été réalisé, utilisant le même milieu de culture BCYT à pH 7,8 et 35 °C à l'exception de l'étape de réduction avec le mélange Cystéine-sulfure qui a été supprimé de façon à avoir une teneur faible en oxygène dans les flacons d'incubation (résazurine rose : potentiel redox $> - 50$ mV).

Temps d'incubation: 90 jours.

ETAPE IV :

Afin d'essayer d'évaluer l'effet d'inhibition de croissance éventuelle liée à la toxicité potentielle de la lignine, une gamme de concentration des lignines a été utilisée. Les concentrations choisies étaient 75, 150, 300 et 600 mg/l. Dans cet essai, 2 composants du milieu de culture (extrait de levure et tryptone), susceptibles de soutenir une croissance bactérienne par eux mêmes, ont été supprimés. Les conditions de température et pH ont été les mêmes que pour l'essai précédent, car c'était dans ces conditions que la meilleure croissance était observée pendant les essais préliminaires.

ETAPES V et VI :

Pour vérifier l'influence de la préparation du milieu dans le taux de biodégradation de la lignine, deux expériences ont été réalisées: l'une où la lignine est prédissoute dans l'eau alcalinisée (pH 10) et stérilisée séparément avant d'être ajoutée aux autres composants du milieu stérile; l'autre où la lignine est mélangée et stérilisée avec le reste des composants du milieu de culture.

Par ailleurs, à part les paramètres déjà indiqués à l'étape VI, nous avons aussi utilisé des lignines "purifiées" aux concentrations indiquées sur le schéma.

ETAPE Va :

Pour le maintien de l'activité microbiologique détectée, les flacons montrant la meilleure croissance ont été réinoculés (à 5% V/V) dans les mêmes conditions. Pour l'essai Va, un volume plus important a été utilisé (800 ml) de façon à pouvoir disposer de plus de matériel pour les analyses et pour la suite des cultures.

ETAPE IX :

Une concentration de 10 g/l de lignine de paille (KRAFT) et d'Induline Westvaco a été utilisé afin de récupérer, après la période d'incubation, la lignine résiduelle qui serait ensuite analysée par résonance magnétique nucléaire (RMN).

ETAPES VIII et X :

Lors de l'analyse par RMN des échantillons lyophilisés d'un des essais précédents, une grande interférence due à la présence du tampon organique HEPES dans le milieu de culture a été observée. Pour supprimer cette interférence, ces deux essais (ainsi que le numéro XI), ont été réalisés en utilisant un milieu de culture sans tampon HEPES.

ETAPE XI :

La lignine de référence (Induline Westvaco) est très peu soluble dans le milieu de culture, malgré le pH alcalin (7,8). Cette caractéristique a été considérée comme un obstacle additionnel pour la biodégradabilité de ce type de substrat. Pour augmenter la solubilité de l'Induline, une solution concentrée dans la soude 0,1 N a été préparée et stérilisée séparément. Elle a été ensuite injectée stérilement dans le milieu de culture. De cette façon, nous avons réussi à obtenir un milieu transparent et sans précipité.

Une deuxième série de flacons a été préparée utilisant comme substrat carboné, l'Induline Westvaco "purifiée" suivant la procédure décrite dans la méthodologie.

B.-Suivi des cultures

Afin d'observer la croissance bactérienne dans les flacons incubés anaérobiquement, plusieurs paramètres analytiques ont été mesurés.

Etant donné qu'il s'agit d'une culture anaérobie, la production de gaz (CH_4 et CO_2) a été mesurée périodiquement, ainsi que la concentration d'acides gras volatils (AGV).

Pour suivre la dégradation de la lignine, les analyses ou mesures suivantes ont été effectuées sur la fraction soluble des prélèvements:

- 1) l'absorbance dans l'ultraviolet à 280 et 310 nm, ainsi que le spectre d'absorption,
- 2) le dosage des résidus polyosidiques,
- 3) la distribution du poids moléculaire des fractions solubles de la lignine par chromatographie sur gel (GPC),
- 4) l'apparition de monomères phénoliques par chromatographie liquide de haute pression (CLHP),
- 5) des observations microscopiques à l'état frais sur des échantillons
- 6) pour les derniers essais, des analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été également réalisés.

Des bilans de dégradation ont été établis à partir de certaines de ces données.

ESSAIS D'ADAPTATION : ETAPE I

Plusieurs variables dans les conditions d'incubation ont été employées lors de ce premier essai (3 valeurs de pH différentes, 2 températures et 4 types de lignines). L'idée initiale était d'essayer une gamme de conditions différentes de façon à avoir une probabilité plus élevée d'adapter les microorganismes à la dégradation de la lignine. L'utilisation d'un milieu de culture contenant l'extrait de levure (Yeast extract, YE) et tryptone permettait d'assurer un équilibre nutritionnel favorable au développement de microorganismes exigeants.

La réduction de l'absorbance à 280 nm a été signalée comme une indication de dépolymérisation [ODIER et MONTIES, 1977 ; MILSTEIN *et al.*, 1981] et biodégradation de la lignine. Ce paramètre a donc été utilisé durant ces essais pour sélectionner les conditions les plus adéquates pour la suite des expériences. Les résultats plus importants obtenus lors des cultures d'adaptation, apparaissent dans le Tableau 6 (page 91), ainsi que dans la Figure 30 (page 92).

La diminution en l'absorbance à 280 nm observée dans les échantillons du premier essai n'est pas considérée comme une preuve suffisante de la dégradation de la lignine car les témoins qui ne contenaient pas de lignine montraient aussi une variation importante en absorbance pendant l'incubation, ainsi qu'une réduction en taille des pics obtenus par chromatographie sur gel (GPC). La présence d'extrait de levure et tryptone dans le milieu de culture pourrait être une interférence dans le suivi des incubations. La concentration d'extrait de levure, 0,5 g/l, est en effet plus importante que celle de la lignine (0,3 g/l). Les complexes polysides-protéines de l'extrait de levure (qui absorbent aussi à 280 nm) peuvent être rapidement consommés par les microorganismes donnant lieu à la diminution de l'absorbance dans l'U.V., ainsi qu'une production de gaz considérable dans les témoins sans lignine.

Tableau 6 : Evolution des paramètres de dégradation à l'étape I
Milieu BCYT réduit à 35°C

Type de lignine	pH	Absorbance à 280 nm			Production de CH ₄ (ml/g de M.O.)
		t ₀	t _r	% réduction	
Paille (soude)	6,2	4,31	4,17	4,4	637
	7	4,26	3,91	8,2	352
	7,8	4,15	3,47	16,4	566
Paille (Kraft)	6,2	4,47	2,58	42,2	712
	7	4,25	3,46	18,6	687
	7,8	4,14	3,7	10,6	633
Sciure peuplier (soude)	6,2	4,48	3,6	19,6	652
	7	4,25	3,31	22,1	437
	7,8	4,14	3,66	11,6	487
Sciure peuplier (Kraft)	6,2	4,42	3,03	31,4	660
	7	4,22	3,63	14	587
	7,8	4,15	2,61	37,1	593
Témoin (sans lignine)	6,2	4,27	1,98	53,6	944
	7	3,83	1,95	49	1108
	7,8	3,79	1,92	49,3	980

t₀ = temps zéro ; t_r = temps final



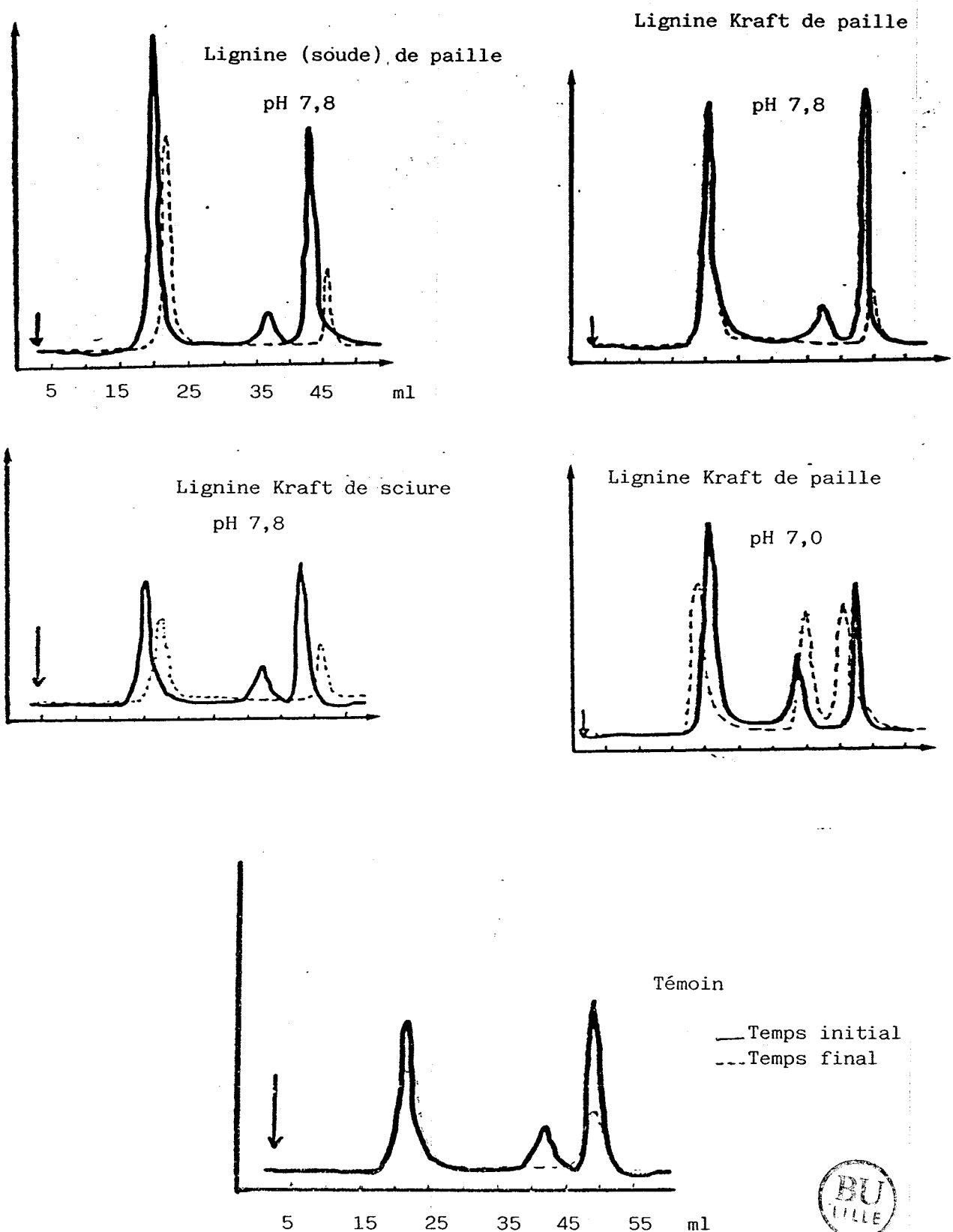


Fig. 30 : Analyse par perméation sur gel des échantillons liquides de l'étape I

Pour ces raisons, les résultats des premiers essais ne sont considérés que comme indicatifs. Toutefois, ces résultats nous ont permis de sélectionner des paramètres de culture plus restreints pour l'essai suivant. Pour établir cette sélection tous les paramètres analytiques ont été tenus en compte, non seulement ceux qui sont indicatifs d'une dégradation de la lignine (absorbance dans l'U.V., GPC) mais aussi la production de méthane et l'abondance de croissance bactérienne (par observation au microscope).

D'autres facteurs doivent aussi être considérés pour l'interprétation des résultats. La solubilité des lignines utilisées n'était pas uniforme, en général des lignines de paille (à la soude et KRAFT) étaient plus solubles dans le milieu. Cette solubilité des lignines était aussi influencée par le pH. Le pH acide (6,2) diminuait la solubilité tandis que les conditions d'alcalinité (pH 7,8) permettaient une meilleure dissolution (Tableau 7).

Tableau 7 : Solubilité des lignines dans le milieu de culture aux différents pH

Type de lignine	pH 6,2	pH 7,2	pH 7,8
Paille (soude)	++	++	+++
Paille (Kraft)	±	++	+++
Sciure (soude)	±	+	+
Sciure (Kraft)	±	±	±

± partiellement soluble
 + peu soluble
 ++ soluble
 +++ complètement soluble

Cet aspect est important car la courbe d'absorbance pour la lignine soluble n'est pas linéaire, ce qui veut dire qu'au dessus d'une certaine concentration de lignine, les valeurs d'absorbance ne varient guère. Ceci explique le choix des lignines et conditions de pH et températures pour les cultures d'enrichissement.

CULTURES D'ENRICHISSEMENT : ETAPE II

Les cultures préliminaires ont donné une indication sur les conditions de culture les plus favorables à la dégradation de la lignine. A partir de ces incubations, nous avons préparé des inoculums pour une culture d'enrichissement dans des flacons d'un litre contenant le même milieu.

Malgré son interférence, l'extrait de levure a été aussi utilisé pour ces incubations car il était important d'avoir un milieu riche afin de favoriser la croissance d'organismes présumés exigeants.

D'autre part, hormis l'utilisation des mêmes méthodes analytiques pour le suivi des incubations à partir des échantillons prélevés, centrifugés périodiquement du milieu de culture, une méthode de fractionnement de ces mêmes échantillons a été utilisée, suivant le schéma proposé par JOKELA *et al.* (1985). Cette méthode permettrait en principe d'isoler les possibles produits intermédiaires (monomères phénoliques) de la dégradation de la lignine et de leur analyse ensuite par CLHP.

I.- Analyses des échantillons non fractionnés

Les résultats des analyses sur des échantillons non fractionnés sont montrés dans le Tableau 8 (page 95) et les Figures 31 et 32 (pages 96 et 97).

Les données résultant des analyses des échantillons prélevés durant ces incubations mettent en évidence des tendances semblables à celles observées lors des premiers essais. Après une période d'incubation d'environ 90 jours des diminutions en absorbance dans l'U.V. (280 nm) ont été observées, une modification dans les spectres d'absorption ainsi que des variations en la

Tableau 8 : Variations de l'absorbance à 280 nm des différentes lignines au cours des essais de l'étape II

Type	pH	Absorbance à 280 nm		
		t_0	t_f	% de réduction
Paille (Kraft)	7	4,071	3,594	14,1
Témoin	7	3,86	4,027	-
Sciure (soude)	7,8	4,364	4,07	10,9
Témoin	7,8	2,201	1,665	18,3
Paille (Kraft)	7,8	3,968	3,565	11,9
Témoin	7,8	1,959	1,979	-
Sciure (Kraft)	7,8	3,376	3,055	18,3
Témoin	7,8	2,001	1,733	13,4

t_0 = temps zéro ; t_f = temps final



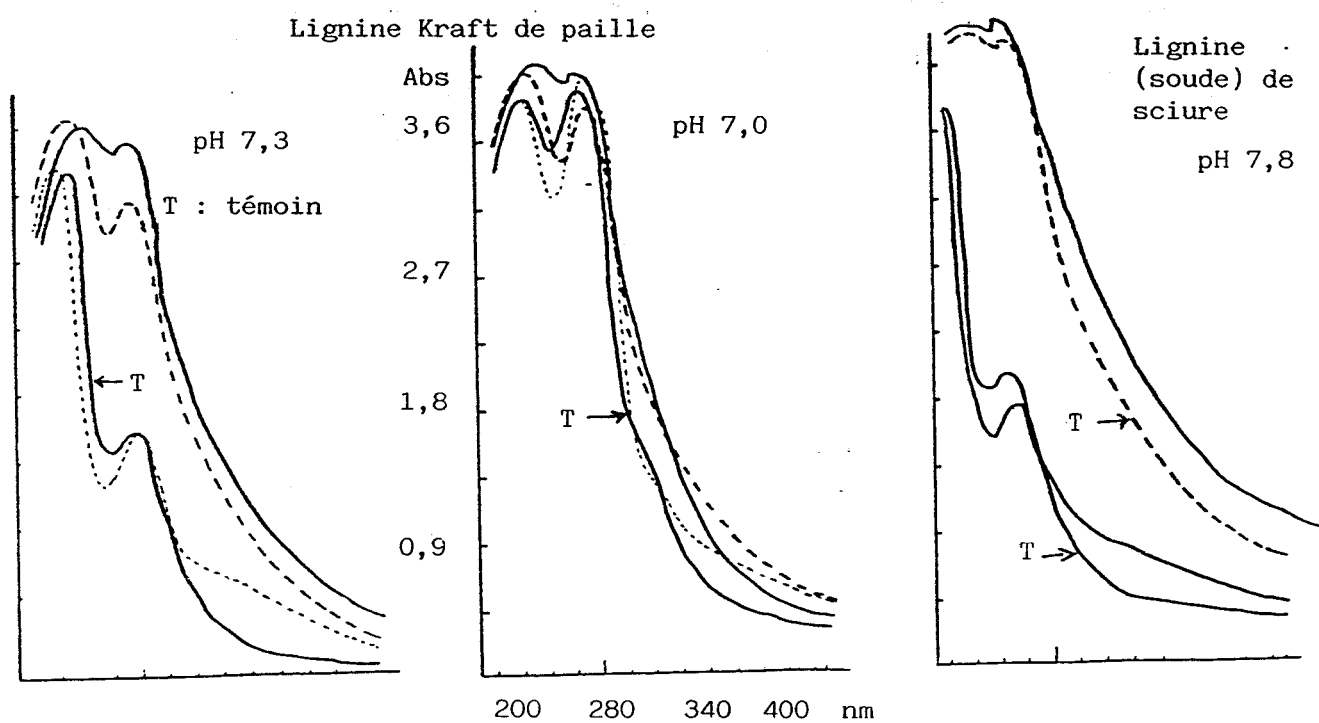


Fig. 31 : Spectres d'absorption U.V. des échantillons liquides non fractionnés de l'étape II



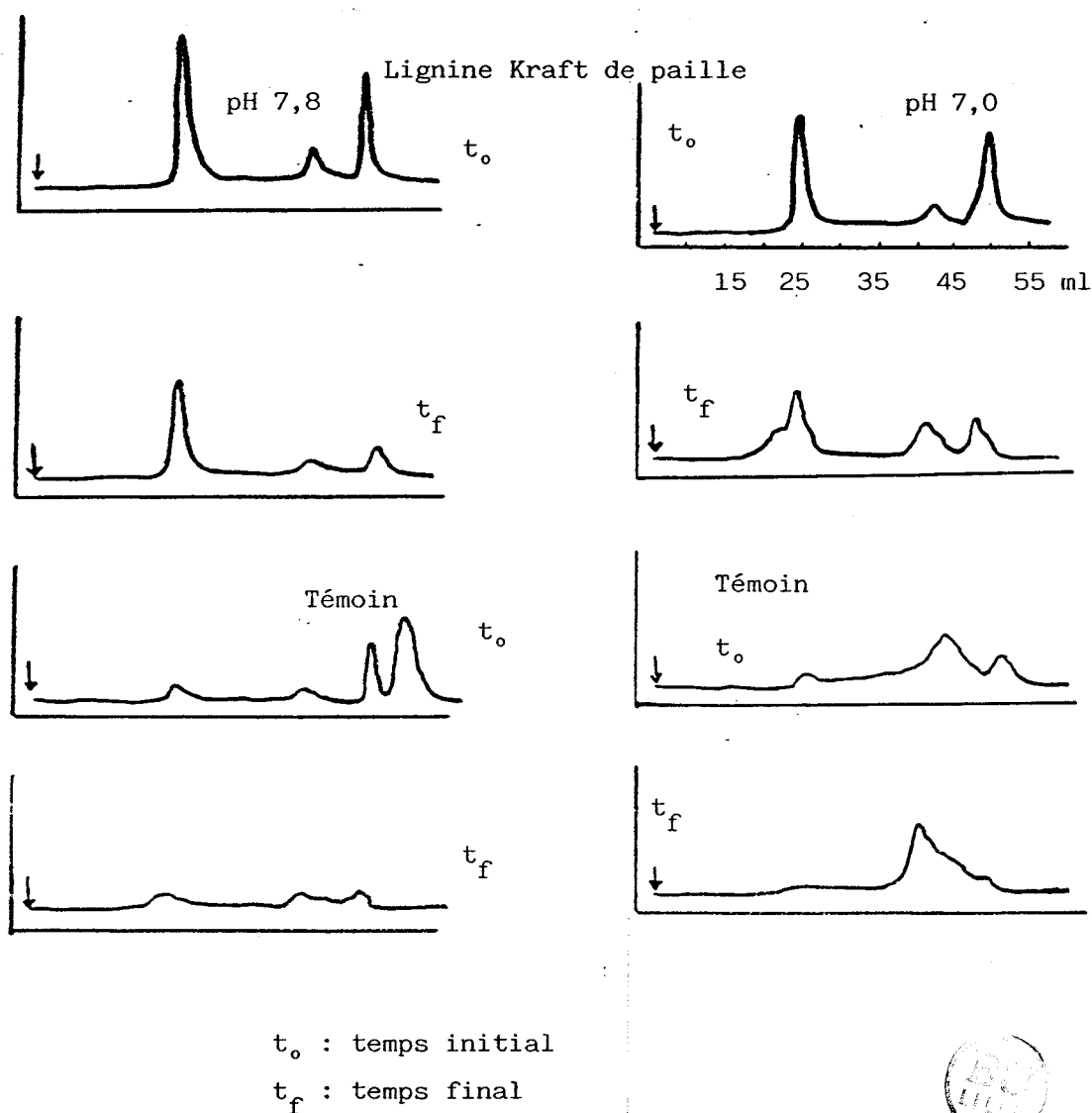


Fig. 32 : Chromatogrammes en perméation sur gel des échantillons liquides non fractionnés de l'étape II

taille et la position des pics élués de la colonne de Séphadex G-25.

Le milieu de culture (BCYT) étant le même que pour l'essai précédent, les interférences analytiques dues à la présence des glycoprotéines de l'extrait de levure ont continué à se manifester, ainsi que le montrent les spectres correspondant aux témoins (sans lignine) pour chaque type de lignine (Figure 31, page 96). Toutefois, la croissance bactérienne était importante, comme le montraient les observations au microscope, donc encourageante pour la suite des expériences. Considérant que d'après ces résultats, nous avons développé une culture mixte capable d'utiliser les lignines modifiées ajoutées au milieu, trois questions fondamentales restaient pour autant à résoudre dans l'immédiat :

a) La présence d'un minimum d'oxygène, ainsi que cela avait été suggéré par le Dr. SALKINOJA-SALONEN (communication personnelle), était-elle nécessaire pour provoquer une dépolymérisation et une dégradation de la lignine ?

b) L'utilisation d'un milieu de culture riche, contenant extrait de levure et tryptone, est-il essentiel pour le développement des bactéries adaptées pendant les expériences réalisées?

c) Des concentrations plus élevées de lignines pourraient-elles avoir des effets inhibiteurs sur la croissance des microorganismes et/ou leur dégradation ?

Pour tenter de répondre à ces questions, plusieurs expériences ont été réalisées (voir Figure 29, page 84) et leurs résultats seront discutés plus tard.

II.- Analyse des fractions

Les deux parties résultant du fractionnement des échantillons liquides prélevés au cours des incubations (voir Figure 27, page 76), ont été analysés de la même façon que les échantillons non fractionnés.

Les fractions solubles dans l'acétate d'éthyle présentent dans tous les cas une absorbance dans l'U.V. moins élevée (Tableau 9, page 100) que celle des fractions insolubles (décrites comme précipitats). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les composés phénoliques monomères ou oligomères de petite taille sont solubilisés dans la couche organique, tandis que les polymères plus grands précipitent dans le milieu acide. Les glycoprotéines de l'extrait de levure devraient en principe se retrouver autant dans la fraction insoluble que dans la fraction soluble, ce qui expliquerait les réductions en absorbance observées dans les témoins qui ne contiennent pas de lignine. Cet effet apparaît plus atténué dans les spectres d'absorption. (Figures 33a et 33b, pages 101 et 102).



La chromatographie sur gel semble indiquer la présence dans la fraction insoluble (précipité) de la majeure partie de l'extrait de levure car l'élution des extraits ne donne pas de pics sur les chromatogrammes de perméation sur gel (Figures 34a et 34b, pages 103 et 104).

L'analyse des extraits par CLHP montre la disparition de certains pics après la période d'incubation (Figures 35a et b, pages 105 et 106) pour toutes les lignines. Les chromatogrammes des témoins ne présentent pas de variation notable entre le début et la fin de l'incubation. Une interprétation possible de ces résultats pourrait être le métabolisme des phénoliques organo-solubles par les microorganismes de la culture mixte. L'identification des composés phénoliques séparés en CLHP est mise en difficulté par la diversité

Tableau 9 : Variations de l'absorbance à 280 nm des différentes fractions de lignines au cours des essais de l'étape II

Type	Fraction (*)	pH	Absorbance à 280 nm		
			t ₀	t _r	% de réduction
Paille (Kraft)	A	7	,77	,39	48,4
	B	7	2,665	1,307	50,9
Témoin	A	7	,3	,295	2,9
	B	7	,66	,05	92,4
Sciure (soude)	A	7,8	,93	,365	60,6
	B	7,8	3,6	1,7	52,6
Témoin	A	7,8	,57	,283	50,6
	B	7,8	,49	,15	69,8
Paille (Kraft)	A	7,8	,308	,15	51,3
	B	7,8	3,14	1,31	58,2
Témoin	A	7,8	,304	,18	40,8
	B	7,8	,464	,19	59
Sciure (Kraft)	A	7,8	,413	,262	36,6
	B	7,8	2,03	,767	62,2
Témoin	A	7,8	,23	,218	4,8
	B	7,8	,05	,15	0

(*)

A = fraction soluble dans l'acétate d'éthyle

B = fraction hydrosoluble reprécipitée par acidification

t₀ = temps zéro ; t_r = temps final



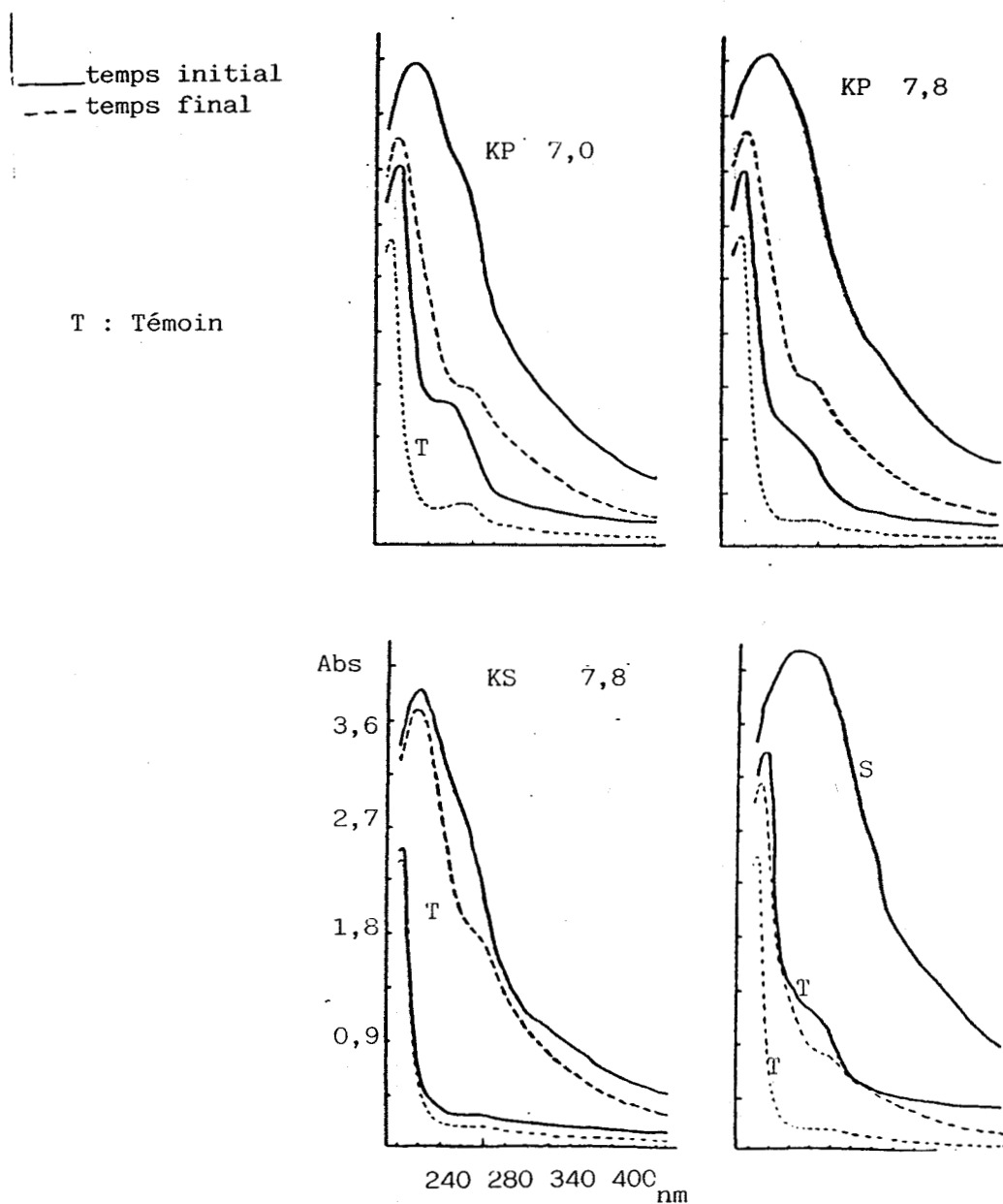


Fig. 33a : Spectres d'absorption U.V. de la fraction précipitée des échantillons liquides de l'étape II (KP = lignine KRAFT de paille)

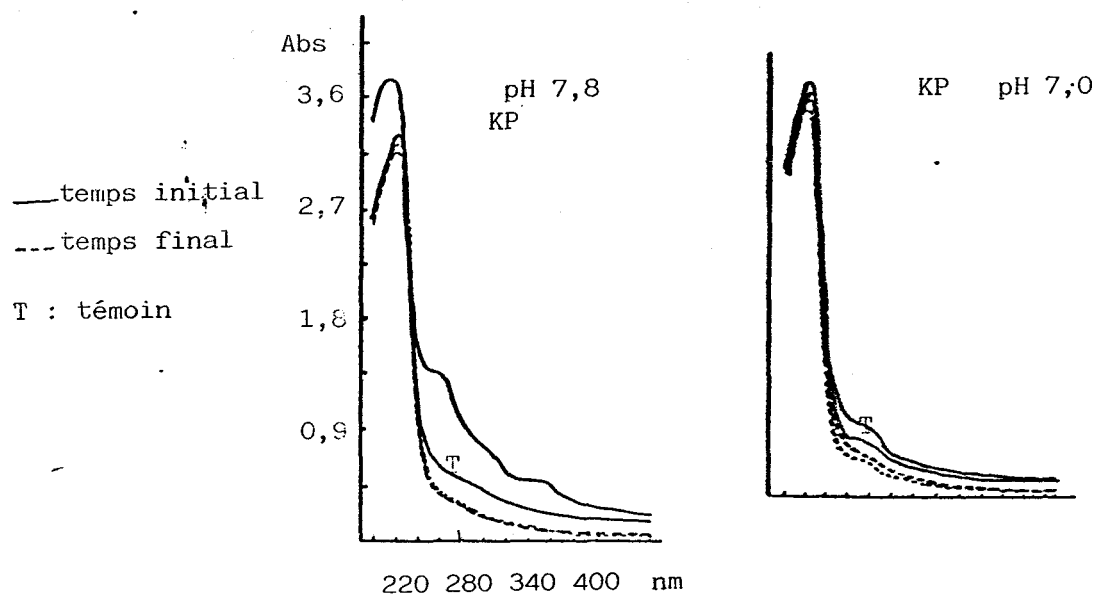


Fig. 33b : Spectres d'absorption U.V. de la fraction organo-soluble des échantillons liquides de l'étape II (KP = lignine KRAFT de paille)



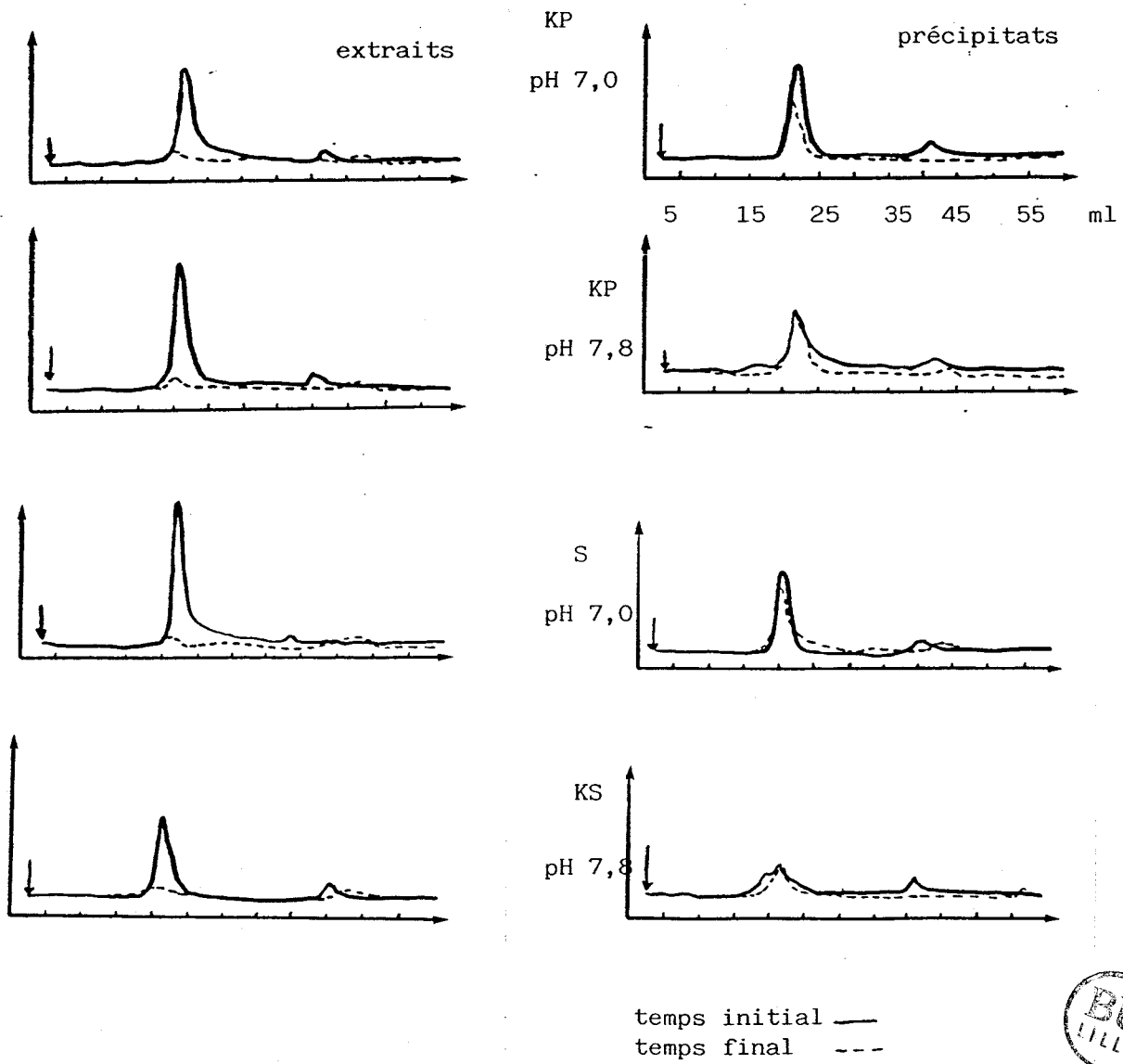


Fig. 34a : Analyse par chromatographie sur gel des fractions¹ des échantillons liquides de l'étape II (KP = lignine KRAFT de paille ; S = lignine soude de peuplier ; KS = lignine KRAFT de peuplier)

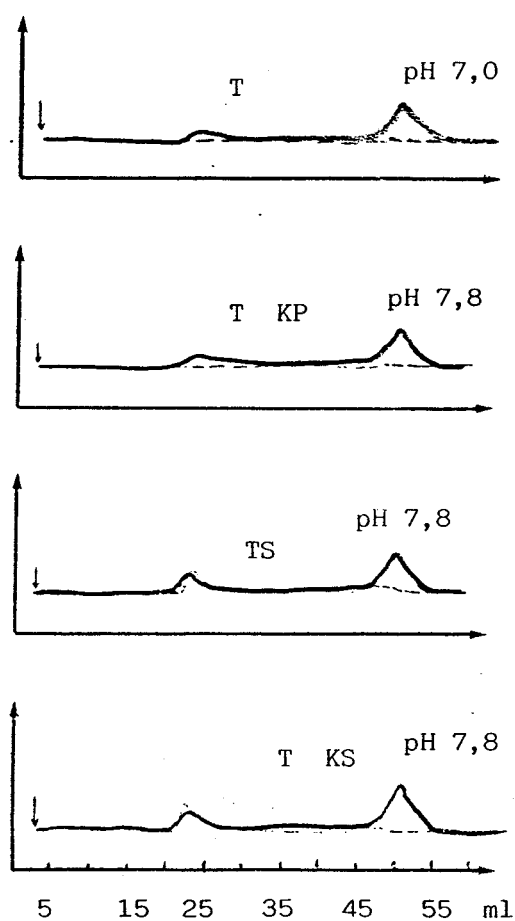


Fig. 34b : Analyse par chromatographie sur gel des fractions des témoins de l'étape II (T = témoin sans lignine ; T_{KP} = témoin sans lignine pour KP ; T_S = témoin sans lignine pour S ; T_{KS} = témoin sans lignine pour KS)

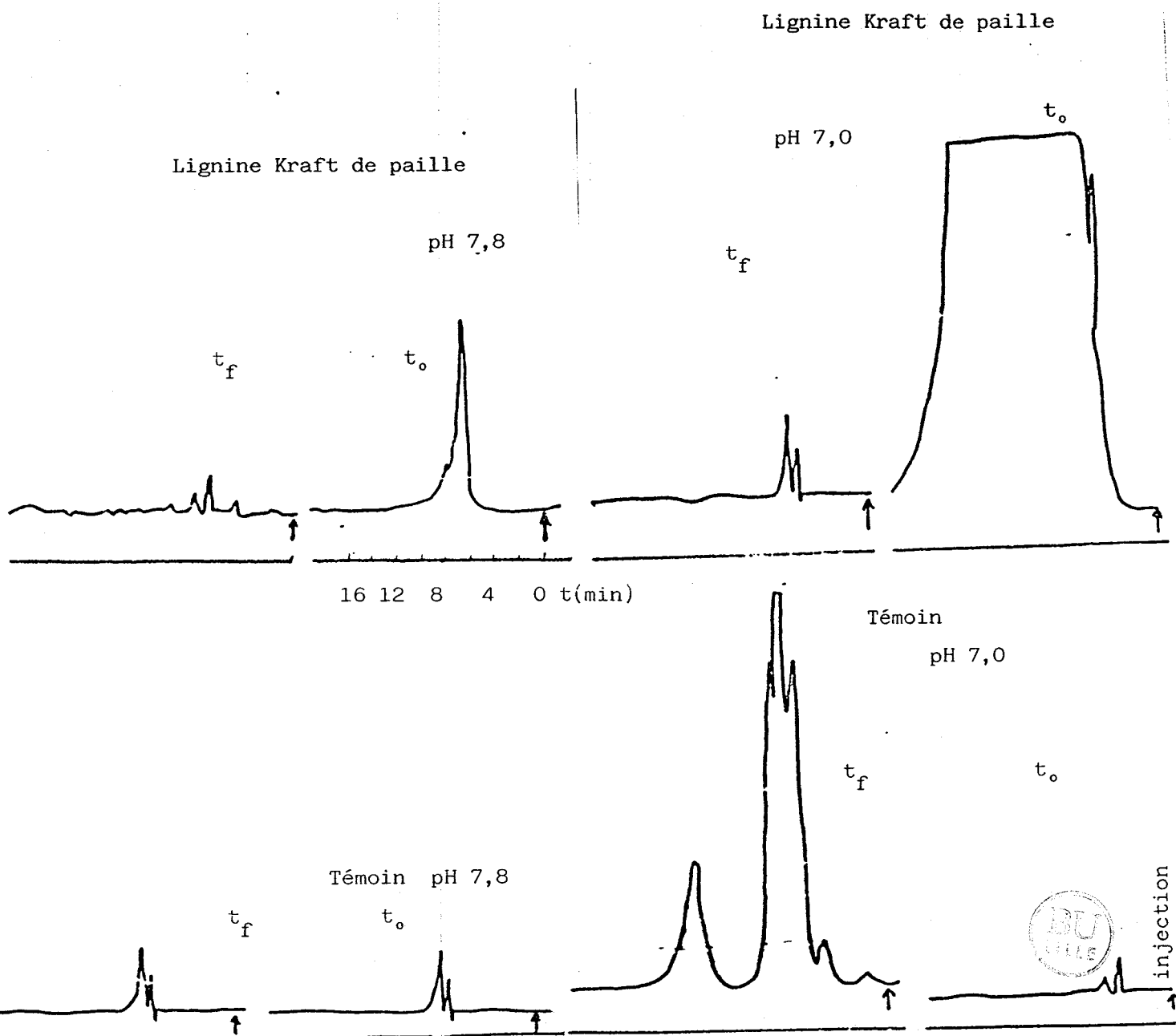


Fig. 35a : Analyse par CLHP des fractions des échantillons liquides de l'étape II

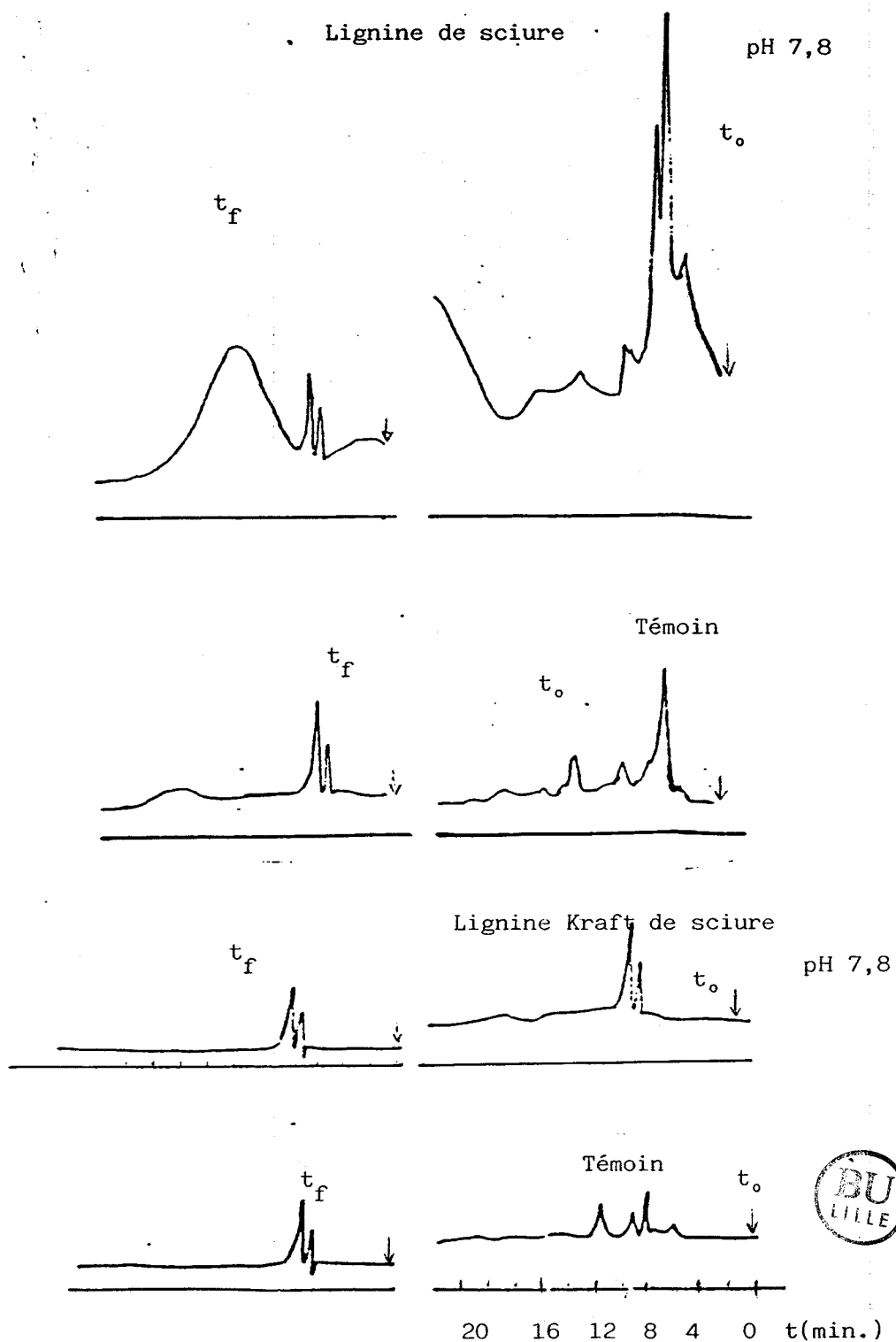


Fig. 35b : Analyse par CLHP des fractions des échantillons liquides de l'étape II (suite)

des structures probables ainsi que par les possibles interactions avec des résidus de polyosides qui pourraient se trouver dans le milieu.

Ces observations nous ont amené à considérer que la procédure de fractionnement apporte des renseignements complémentaires mais non d'évidence concluante sur la dépolymérisation de la lignine dans les conditions de l'étude. C'est pour cela que dans les expériences ultérieures, cette procédure de séparation des échantillons n'a pas été employée ; en revanche, nous avons préféré agir sur d'autres variables concernant les conditions de culture, comme indiqué à la Figure 29 (page 84).

**EFFETS DE CONDITIONS MICROAEROPHILES
ET DE LA CONCENTRATION
DE LIGNINE : ETAPE III**

Les variables introduites dans cette étape du travail étaient, d'une part l'utilisation de conditions microaérophiles déjà décrites, et d'autre part, l'établissement d'une gamme de concentration des lignines allant de 75 à 600 mg/l. Une série de flacons contenant le même milieu (BCYT) mais réduit cette fois, a été préparée au même temps.

La sélection du pH 7,8 pour cette expérience obéit essentiellement aux critères de solubilité expliqués auparavant, aussi bien qu'aux observations visuelles et microscopiques sur la densité de la croissance bactérienne à ce pH. Il en est de même pour le type de lignine qui a été limité à la lignine KRAFT de paille.

La production de méthane, exprimée en ml CH_4 /g M.O. a été suivie par des prélèvements périodiques d'échantillons de l'atmosphère des flacons d'incubation, analysés ensuite par chromatographie en phase gazeuse.

La cinétique de production de méthane qui est illustrée à la Figure 36, page 109) montre que seule la concentration la plus faible en lignine (75 mg/l) favorisait une production de méthane plus importante que celle du témoin sans lignine. Les concentrations de 150 et 300 mg/l de lignine donnaient un rendement en méthane semblable à celui du témoin, tandis que les flacons à 600 mg/l de lignine avaient une méthanisation plus faible que celle du témoin. Ceci impliquerait un possible effet inhibiteur de la lignine sur la méthanogénèse, au dessus d'une certaine concentration. Une telle inhibition

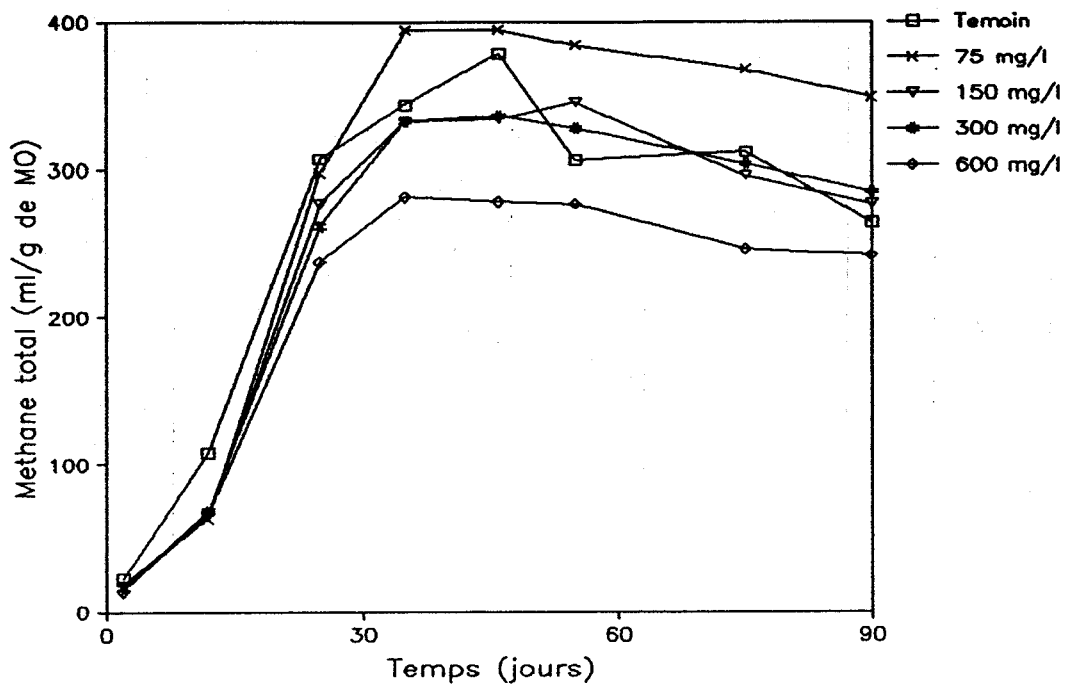


Fig. 36 : Cinétiques de production de méthane à l'étape III

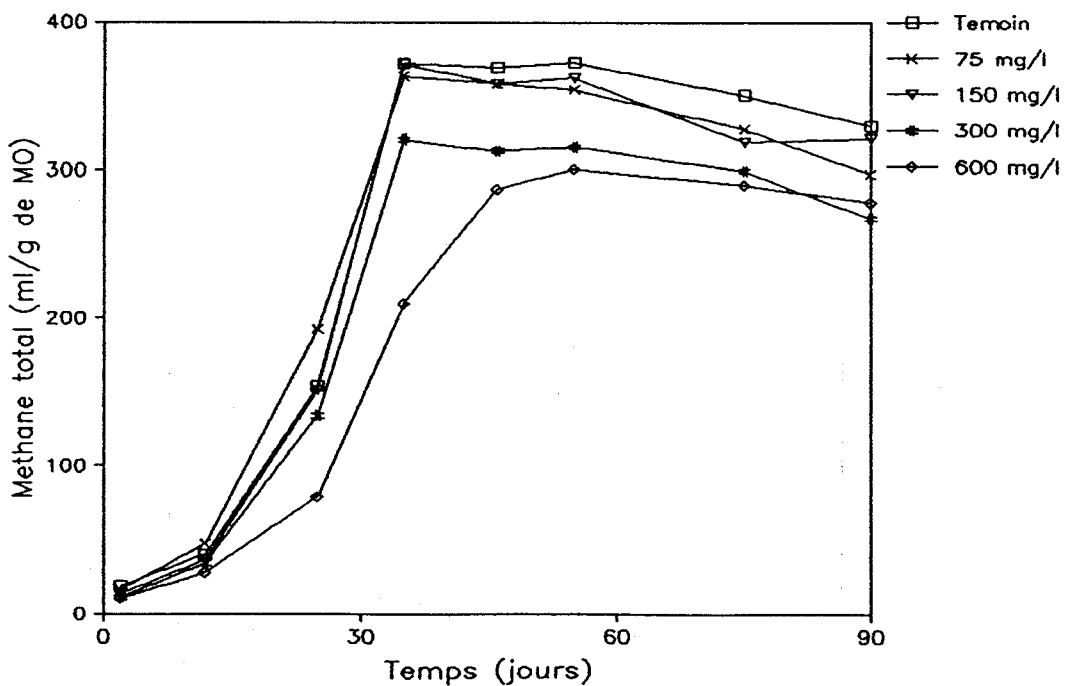


Fig. 37 : Cinétiques de production de méthane pour un milieu non réduit à l'étape III



pourrait être expliquée par la sensibilité des méthanogènes aux toxiques tels que les composés phénoliques qui pourraient apparaître dans le milieu comme résultat de l'addition des lignines et de son éventuelle dépolymérisation.

D'autre part, il paraît évident que la majeure partie du méthane retrouvée dans l'atmosphère des flacons provienne du métabolisme de l'extrait de levure et de la tryptone. En conséquence, lorsque l'on utilise un milieu riche comme le BCYT pour des essais de dégradation de lignine, la production de méthane ne suit pas la même cinétique que la dégradation de lignine et ne convient donc pas en tant que paramètre cinétique de suivi pour ce type d'expérience.

Par ailleurs, en ce qui concerne l'utilisation de conditions microaérophiles, on peut conclure que la non réduction du milieu n'apporte pas d'amélioration sur la production de gaz. Une différence minime entre les volumes de méthane produits par les milieux réduits avec le mélange cystéine-sulfure, et non réduits a été détecté comme l'illustre la Figure 37 (page 109). Mais cette différence, tout comme celles observées avec les autres paramètres (voir ci-après), n'a pas été suffisante pour justifier des essais ultérieurs. Cela ne veut pas dire, pour autant, qu'on rejette complètement l'hypothèse de ce qu'une tension minimale d'oxygène pourrait aider à la rupture des liaisons inter-monomères par un mécanisme oxydatif induit chez les microorganismes en présence de la lignine. Cependant, les conditions expérimentales devraient sûrement être ajustées.

Mise en évidence de la dégradation de la lignine

En ce qui concerne les mesures analytiques pour montrer la dégradation de la lignine, deux observations essentielles ont été réalisées:

1) tout d'abord, nous avons observé que le fait de laisser une pression minimale d'oxygène dans l'atmosphère des flacons d'incubation influence très peu les variations en absorbance durant la période étudiée (Tableau 10, page 112). De plus, l'effet observé serait plutôt négatif, car en général, il y a une réduction moins importante en absorbance dans les flacons non réduits comme le montrent les spectres d'absorption (Figure 38, page 113).

2) deux cinétiques différentes sembleraient avoir lieu lors de ces incubations:

a) l'extrait de levure et la tryptone fonctionnant comme source d'énergie facilement disponible et qui seraient donc relativement rapidement consommés, donnaient lieu à une production de méthane et une importante diminution en l'absorbance dans l'U.V. due à l'utilisation et incorporation dans les cellules des protéines et des acides aminés provenant de l'extrait de levure.

b) lorsque le milieu contient des lignines, le métabolisme des bactéries semble évoluer différemment. Un possible effet inhibiteur pourrait se produire dans les flacons contenant des lignines, surtout en ce qui concerne la méthanogénèse. Toutefois, une population microbienne se développe et une dépolymérisation partielle des lignines semblait avoir lieu, comme le suggèrent les chromatogrammes de perméation sur Séphadex G-25 (Figure 39, page 114).

L'analyse par chromatographie liquide de haute précision (CLHP) n'apporte pas de précisions sur la dégradation de la lignine, mis à part la disparition ou réduction de certains pics correspondants à la fraction non retenue dans la colonne.

Concernant le dosage des sucres totaux (par la méthode du phénol-sulfurique), la comparaison des valeurs initiales et finales d'absorbance à

Tableau 10 : Evolution des sucres et des lignines au cours de l'étape III
Lignine KRAFT de paille

A. Milieu BCYT non réduit pH 7.8

Sucres (D.O. 492 nm)					
Temps (jours)	Témoin	75 mg/l	150 mg/l	300 mg/l	600 mg/l
2	1,051	1,185	1,498	1,651	2,293
46	,065	,138	,166	,196	,408
93	,043	,113	,112	,188	,362
Lignine (D.O. 280 nm)					
2	1,386	2,028	2,57	3,62	4,12
46	,467	,96	1,36	2,41	4,1
93	,423	,87	1,36	2,33	3,96

B. Milieu BCYT réduit pH 7.8

Sucres (D.O. 492 nm)					
Temps (jours)	Témoin	75 mg/l	150 mg/l	300 mg/l	600 mg/l
2	1,035	1,361	1,18	1,95	2,46
46	,095	,068	,108	,243	,345
93	,051	,087	,102	,23	,315
Lignine (D.O. 280 nm)					
2	1,892	2,5	2,996	3,91	4,12
46	,818	1,04	1,59	2,819	4,17
93	,483	,96	1,34	2,56	3,93



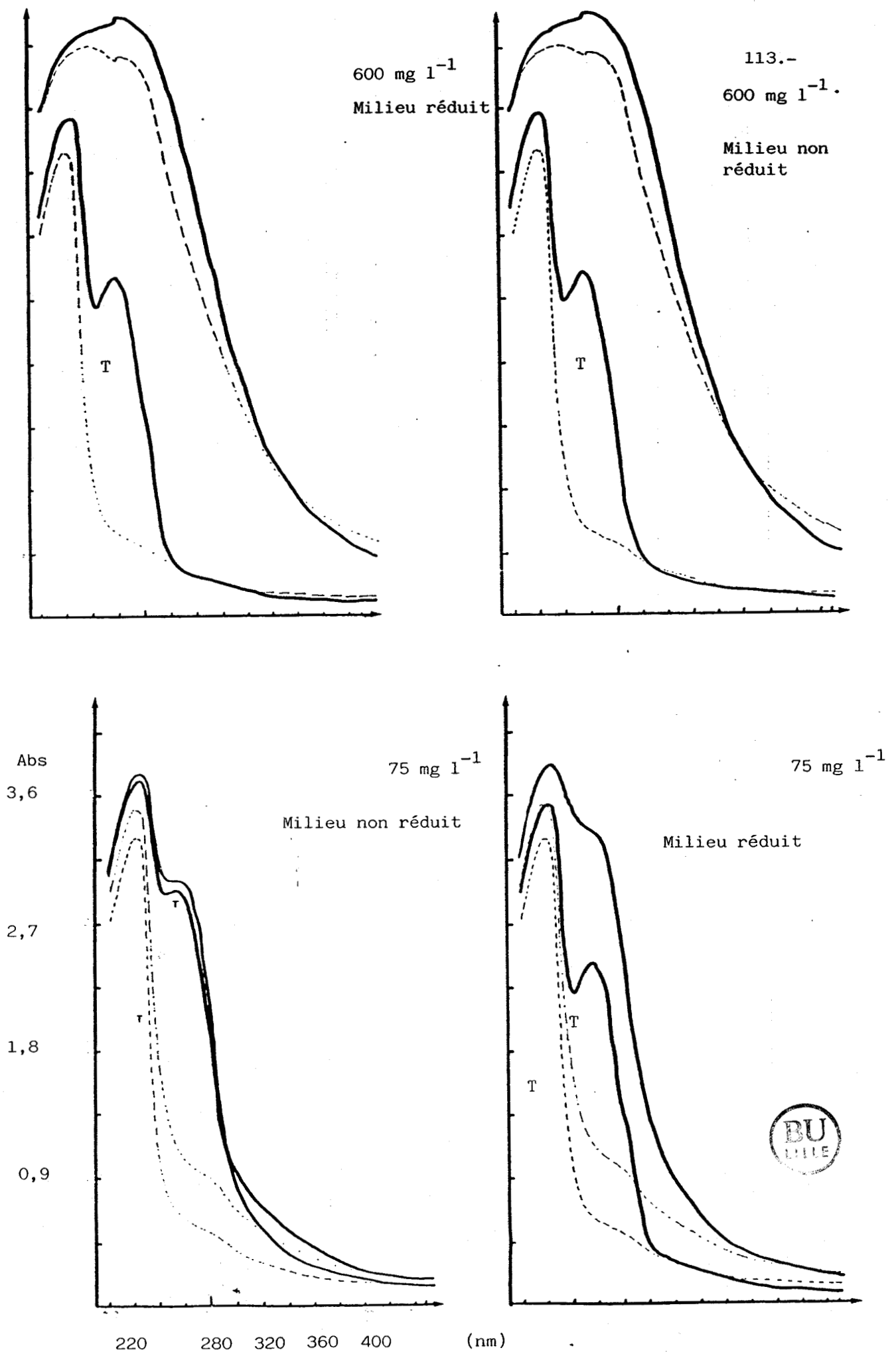


Fig. 38 : Spectres d'absorption U.V. des échantillons de l'étape III

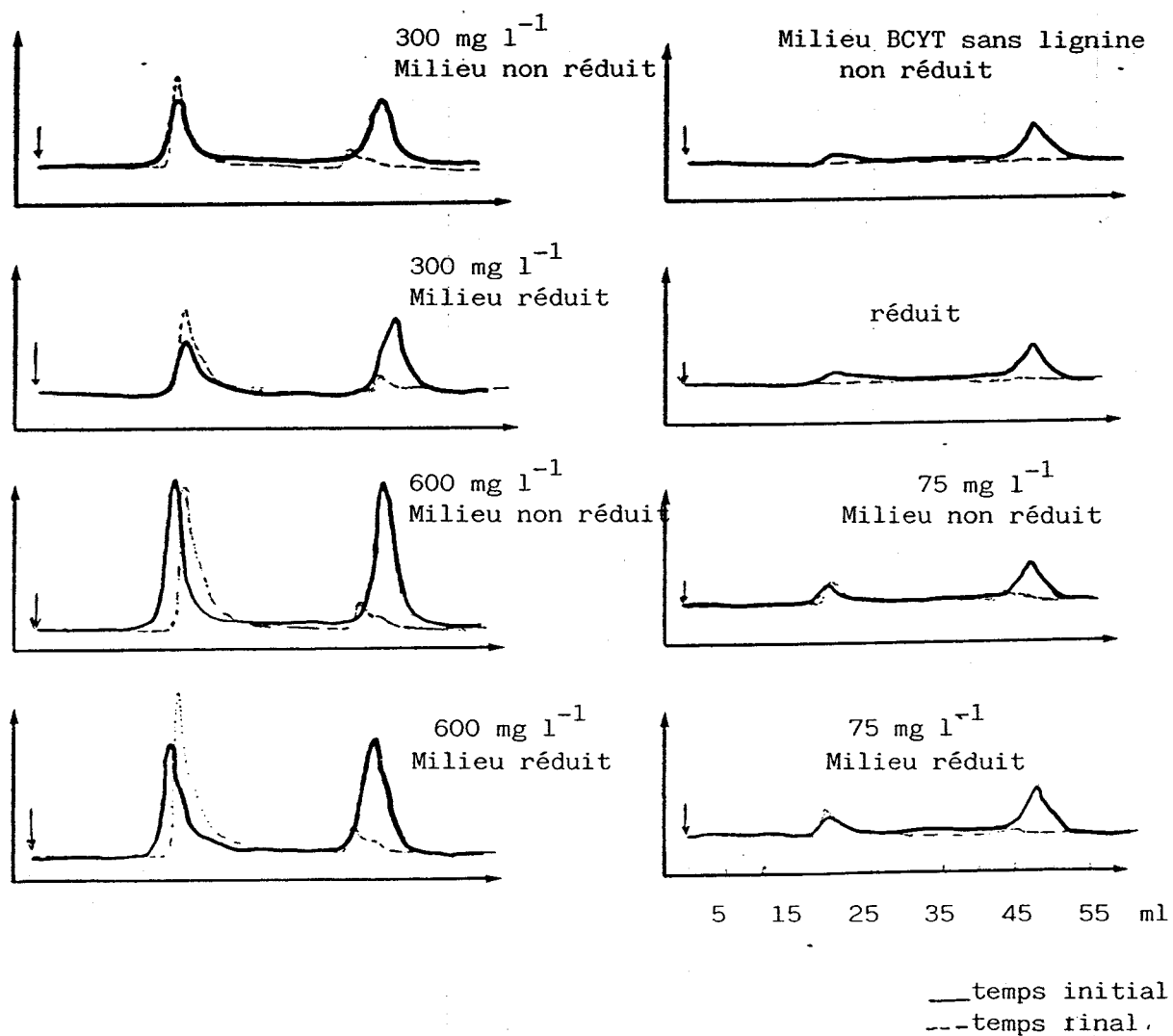


Fig. 39 : Analyse par chromatographie sur gel des échantillons de l'étape III

492 nm, permet de conclure à la consommation presque complète des sucres solubles dans le milieu de culture par les microorganismes de la culture. Cependant, à ce propos, il convient d'analyser les données avec prudence car la méthode de dosage utilisée pourrait présenter des interférences dues à la formation de chromophores en milieu acide par les monomères phénoliques potentiellement présents dans le milieu de culture. Toutefois, malgré cet inconvénient, cette technique permet d'observer un autre aspect du métabolisme de la culture mixte étudiée. Si on admet que le dosage concerne exclusivement les oses présents dans le milieu, il faudrait considérer que les sucres soit de l'extrait de levure ou de la lignine, sont utilisés rapidement par les bactéries en tant que source d'énergie, et que la lignine n'est que légèrement attaquée.

Conclusions

Les conditions microaérophiles n'ont pas modifié la cinétique d'utilisation de la lignine dans les conditions expérimentales employées. D'autres modifications concernant l'environnement de croissance pour les microorganismes sont nécessaires afin de pouvoir observer et mesurer plus précisément les changements chimiques et structuraux ayant lieu pendant la période d'incubation.

CULTURES DANS UN MILIEU**MINERAL : ETAPE IV**

L'utilisation d'un milieu de culture enrichi (BCYT) au début de ce travail a peut être facilité l'adaptation des microorganismes de l'inoculum original aux substrats ligninoïdes ajoutés comme sources de carbone. Cependant ainsi qu'il a été signalé précédemment, certains composants du milieu, notamment l'extrait de levure et la tryptone, masquaient le métabolisme des lignines pendant les incubations rendant donc difficile la mise en évidence de la dégradation de ces composés.

Considérant qu'après deux périodes d'incubation d'environ 100 jours chacune, les microorganismes de la culture mixte utilisée pourraient pousser utilisant la lignine modifiée comme seule source de carbone et afin d'éviter les interférences dues à l'extrait de levure et la tryptone un milieu minimum BC (sans extrait de levure, ni tryptone) a été préparé et une gamme de concentration de lignine (lignine KRAFT de paille de blé) a été ajoutée aux flacons d'incubation.

Une réduction sensible dans la production de méthane par rapport aux essais précédents a été observée tout au long de cet essai. D'autre part, la quantité de méthane (en ml CH₄/g M.O.) dans les flacons témoins était moins importante que dans les échantillons. Par ailleurs, une relation directe entre la production de méthane et la concentration du substrat carboné a pu être observé. (Figure 40, page 117). Ces observations ont permis de déduire que:

a) l'absence de sources de carbone et d'énergie rapidement disponibles telles que l'extrait de levure et la tryptone restreint l'activité

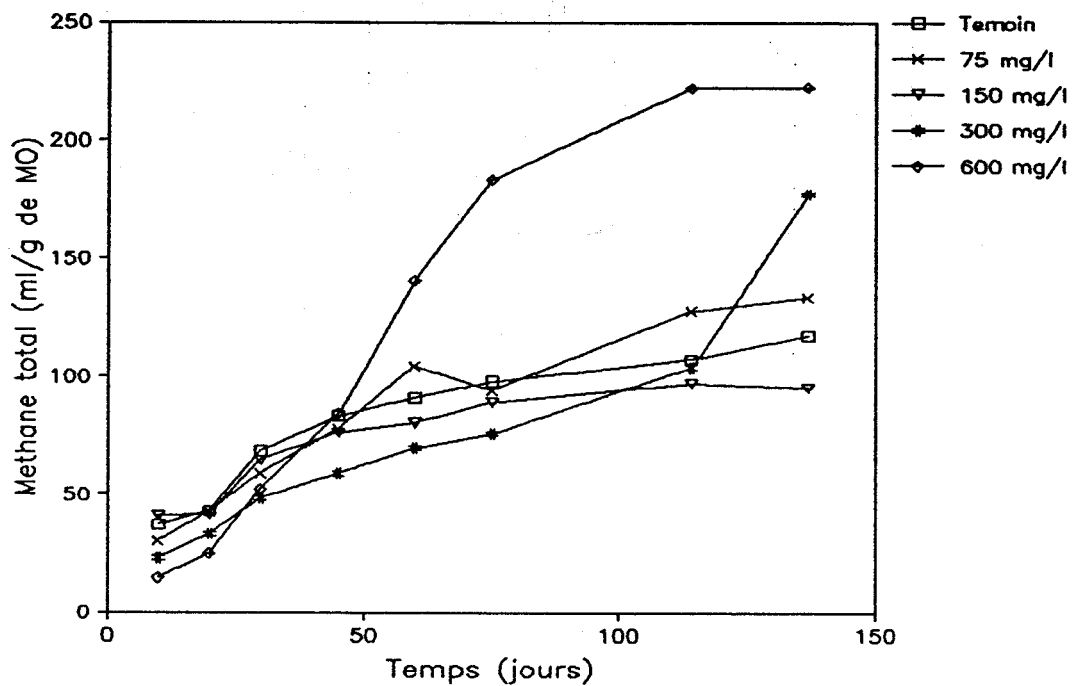


Fig. 40 : Cinétiques de production de méthane à l'étape IV



méthanogénique et provoque un changement dans la cinétique globale des cultures.

b) l'utilisation de la lignine modifiée comme source de carbone ne comporte pas des effets inhibiteurs sur l'activité microbienne à aucune des concentrations employées lors de cet essai. La croissance bactérienne était abondante ainsi que le montraient les observations au microscope des échantillons prélevés.

c) l'apparition d'AGV dans le milieu de culture semble être irrégulière, mais est apparemment liée à la production de méthane; ainsi, elle est plus importante vers le 45^{ème} jour, juste avant le maximum de production de méthane, que vers la phase finale de l'essai (115 jours) ou la production de gaz semblait ralentir (Tableau 11, page 119).

Concernant le suivi de dégradation de lignine par les variations en absorbance, les résultats obtenus montrent que:

- pour les témoins, il n'y a pratiquement pas de modification dans les valeurs initiales et finales d'absorbance. Les réductions en absorbance les plus accentuées apparaissent aux concentrations de lignines les plus élevées (300 et 600 mg/l) malgré le fait qu'au dessus d'une certaine concentration de lignine dans le milieu, la relation absorbance-concentration devienne logarithmique (Figure 41, page 120).

Le passage des échantillons à travers de la colonne de G-25 montrait aussi des déplacements et diminution des pics en comparaison des pics de départ. Ceci indique une probable dépolymérisation des fractions les plus lourdes de la lignine ainsi que le catabolisme des molécules plus petites correspondant au deuxième pic dans les chromatogrammes à 2 pics obtenus pour tous les échantillons (Fig. 42, page 121).

Tableau 11 : Evolution des paramètres de dégradation à l'étape IV
Lignine Kraft de paille
Milieu BC réduit pH 7.8

A. Sucres (mg/l)

Temps	Témoin	75 mg/l	150 mg/l	300 mg/l	600 mg/l
10	4,52	50,74	43,34	206,58	452,47
45	,08	4,11	2,71	12,01	63,49
115	1,97	4,03	5,59	13,65	36,35
150	3,13	6,83	9,13	16,20	

B. Lignine (D.O. 280 nm)

Temps	Témoin	75 mg/l	150 mg/l	300 mg/l	600 mg/l
10	,649	1,222	1,207	3,048	4,188
45	,657	1,193	1,178	2,491	4,079
115	,688	1,171	1,182	2,46	4,044
150	,676	1,163	1,135	2,47	

C. A.G.V. (g/l)

Temps	Témoin	75 mg/l	150 mg/l	300 mg/l	600 mg/l
10	0	0	0	0	0
45	0,07	0,13	0,15	0,17	0,18
115	0,04	0,09	0,03	0	0
150	0,15	0,21	0,28	0,04	0



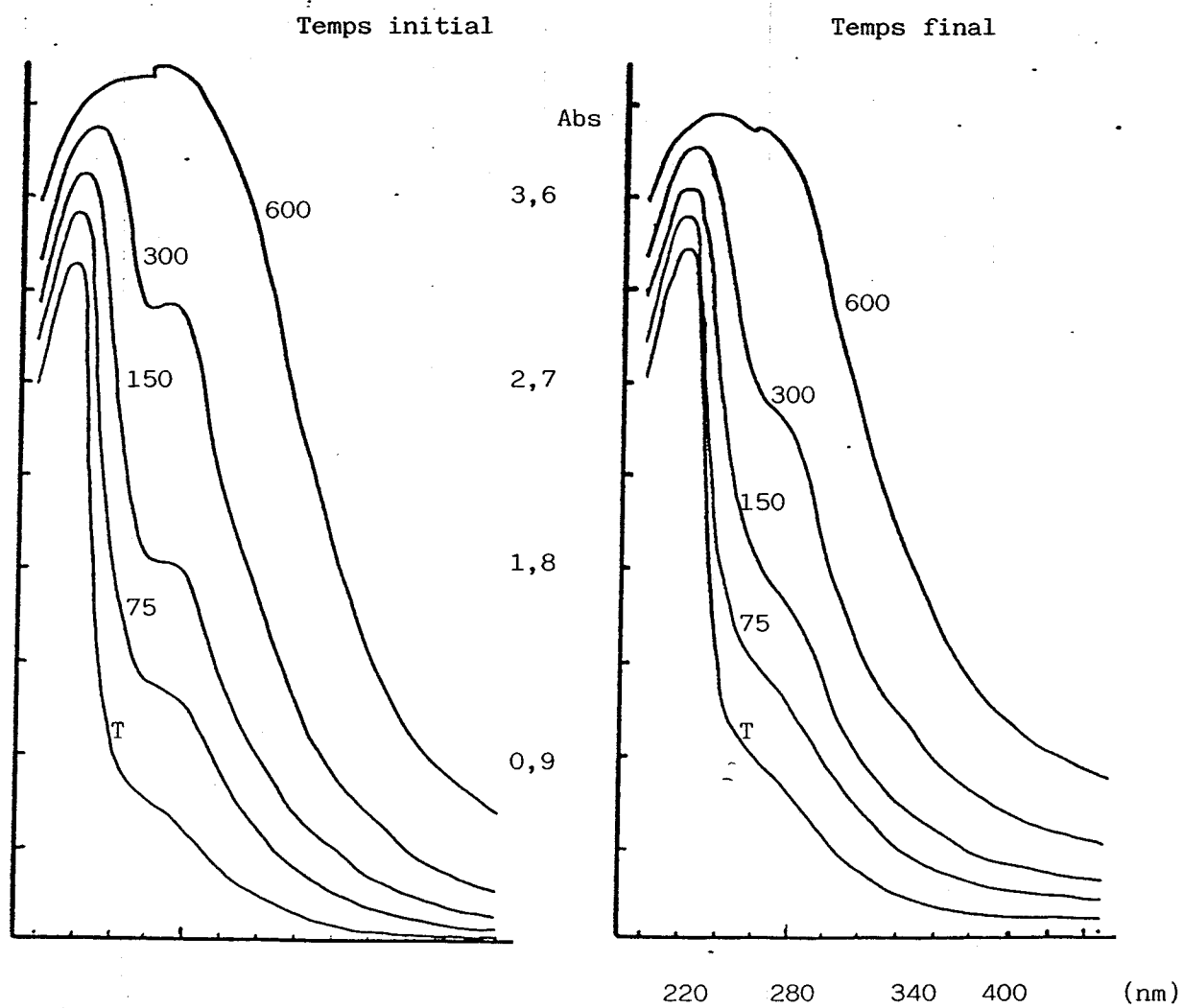


Fig. 41 : Spectres d'absorption U.V. des échantillons liquides de l'étape IV

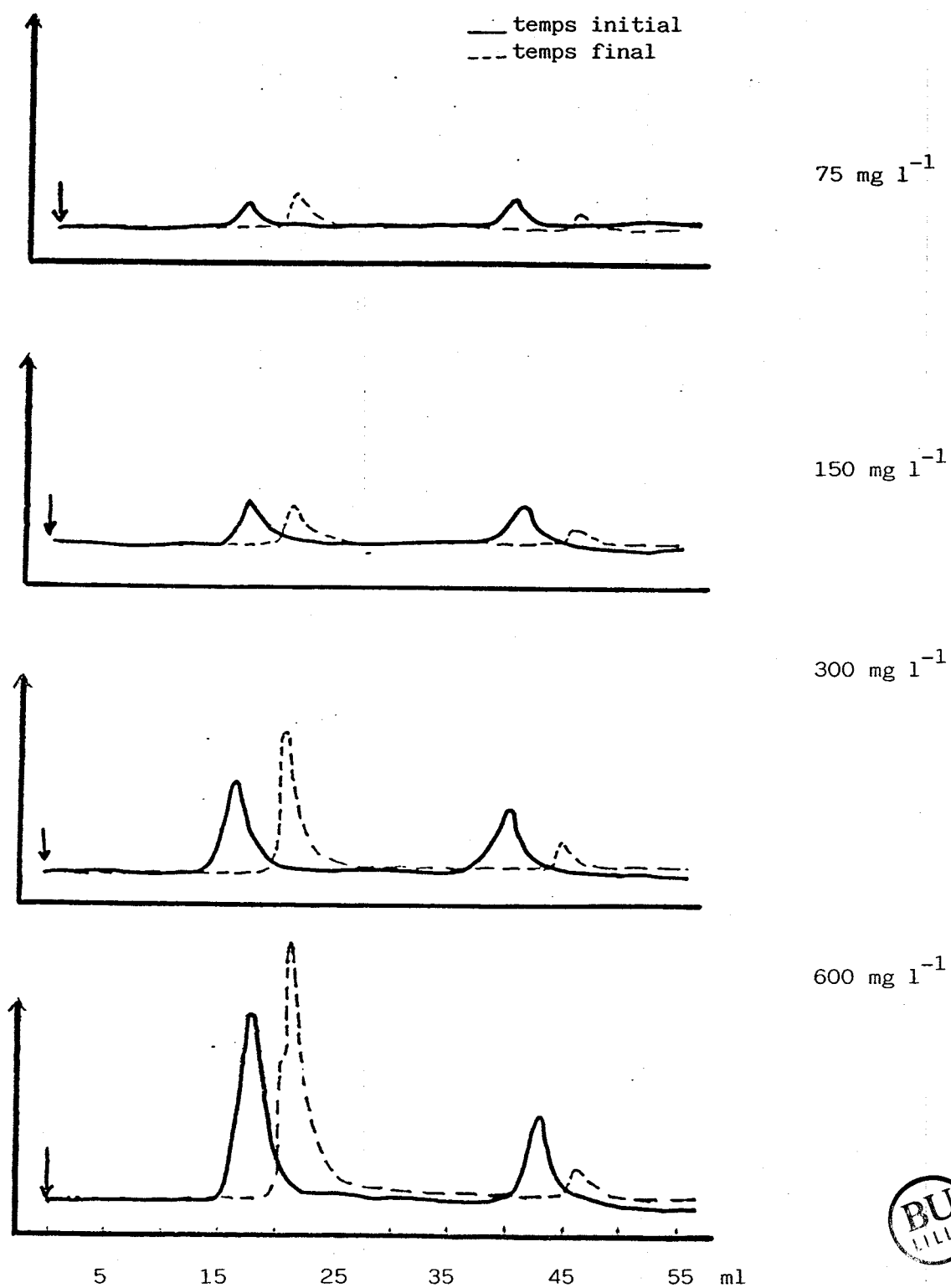


Fig. 42 : Chromatogrammes en perméation sur gel des échantillons liquides de l'étape IV

Le dosage des sucres totaux signale une diminution considérable dans le contenu des sucres pendant la période d'incubation, leur utilisation comme source d'énergie pouvant favoriser le catabolisme de la partie polymérisée des lignines doit être considérée (Tableau 11, page 118). Aucune accumulation de monomères phénoliques n'a pu être mise en évidence par les analyses en CLHP, ce qui pourrait impliquer qu'ils sont transportés et métabolisés rapidement à l'intérieur des cellules.

Conclusions

Les microorganismes adaptés préalablement sont capables de pousser dans un milieu contenant uniquement des lignines modifiées comme source de carbone. Une production mineure, mais détectable, de méthane a été retrouvée pendant la période d'incubation étudiée.

Les fractions de poids moléculaires moins élevées ont été plus facilement métabolisées que celles de taille moléculaire plus grande, comme l'illustrent les analyses en chromatographie sur gel. Cette observation avait déjà été mentionnée par COLBERG et YOUNG (1982, 1985) dans des conditions similaires.

Par ailleurs, les résidus d'hémicellulose liés covalentiellement à la lignine (même après l'extraction) pourraient fournir l'énergie aux microorganismes adaptés pour effectuer la dépolymérisation des polymères complexes. Cette hypothèse pourrait expliquer la cinétique d'utilisation des sucres (dosés par le phénol-sulfurique) observée tout au long de ces expériences.

DEGRADATION DES LIGNINES PURIFIEES :**ETAPE V**

La présence de résidus de polysides liés physiquement ou chimiquement à la lignine utilisée comme substrat dans nos expériences, avait été mise en évidence par des dosages de sucres totaux. Il est évident que les méthodes utilisées pour la préparation des lignines (détaillées dans la méthodologie) ne produisaient pas des lignines "pures" et des résidus d'hemicellulose ou d'autres sucres liés à la paroi végétale pourraient résister au traitement et rester attachés à la lignine par des liaisons covalentes ou non.

Ceci pourrait signifier une complication au niveau de l'interprétation des résultats lors des essais de dégradation de lignine. Pour essayer de surmonter cet obstacle, nous avons cherché dans la littérature une méthode de purification [LUNQUIST et KIRK, 1980] capable d'enlever une fraction importante des sucres "collés" aux lignines. Une fois "purifiées" les lignines préparées au laboratoire, de même que la lignine commerciale utilisée comme référence (Induline AT) ont été ajoutées comme substrats carbonés et leurs cinétiques de dégradation comparées à celles des mêmes lignines non purifiées.

La procédure de purification utilisée produit deux fractions, l'une formée par lignine soluble dans la phase organique, et l'autre comprenant la majeure partie des sucres ainsi que les parties hydrosolubles de la lignine. Les deux fractions ont été ajoutées comme sources de carbone lors de cet essai. Un facteur important, à souligner pour cette expérience, est celui de la solubilité des lignines ajoutées au milieu. A la différence des essais précédents dans lequel la lignine fût ajoutée au milieu de culture avant la

stérilisation, dans ces essais, les lignines furent prédissoutes (partiellement ou complètement selon le type de lignine) dans de l'eau alcalinisée à pH 11, et stérilisées séparément avant d'être additionnées au milieu de culture. Ces lignines avaient des solubilités variables allant de très solubles pour les lignines KRAFT de paille (surtout la lignine non purifiée) jusqu'à très peu solubles pour les Indulines, spécialement la fraction organosoluble.

Suivi de la dégradation des lignines

Les deux types de lignines utilisées pour ces essais ont été incubés dans les mêmes conditions, et des prélèvements de l'atmosphère des flacons et du liquide de culture ont permis d'établir une cinétique probable du cours des incubations.

Une production négligeable de méthane a été détectée pendant ces manipulations, même après 120 jours d'incubation. Néanmoins, une activité méthanogénique plus forte a pu être observée dans les flacons contenant la lignine KRAFT de paille comparée à ceux contenant l'Induline (Figure 43, page 125).

Pour l'Induline commerciale, on observe une diminution importante de l'absorbance à 280 nm après 118 jours d'incubation (temps final) pour l'Induline et ses deux fractions. L'absorbance diminue plus rapidement pendant les 60 premiers jours (Figure 44, page 125) et graduellement vers la fin de l'expérience. En revanche, les sucres totaux (Tableau 12a, page 126) montrent une augmentation en concentration après les 60 premiers jours d'incubation et une diminution vers la fin.

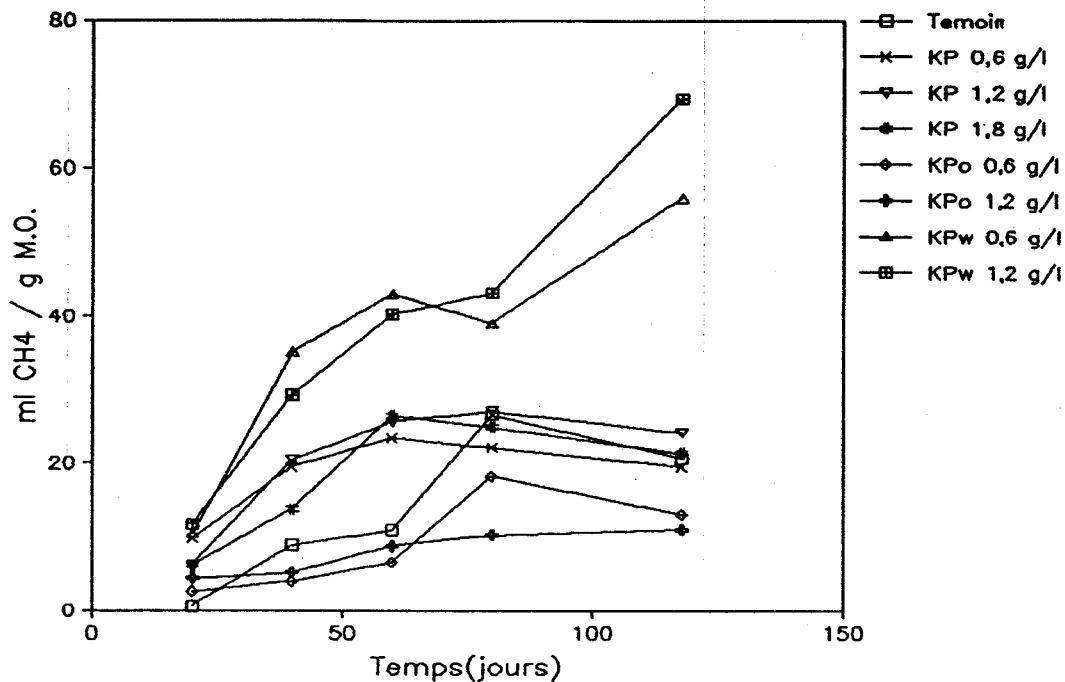


Fig. 43 : Cinétiques de production de méthane pour la lignine KRAFT de paille à l'étape V
 [KP = lignine KRAFT de paille; KPo = fraction organique de KP ;
 KPw = fraction aqueuse de KP]

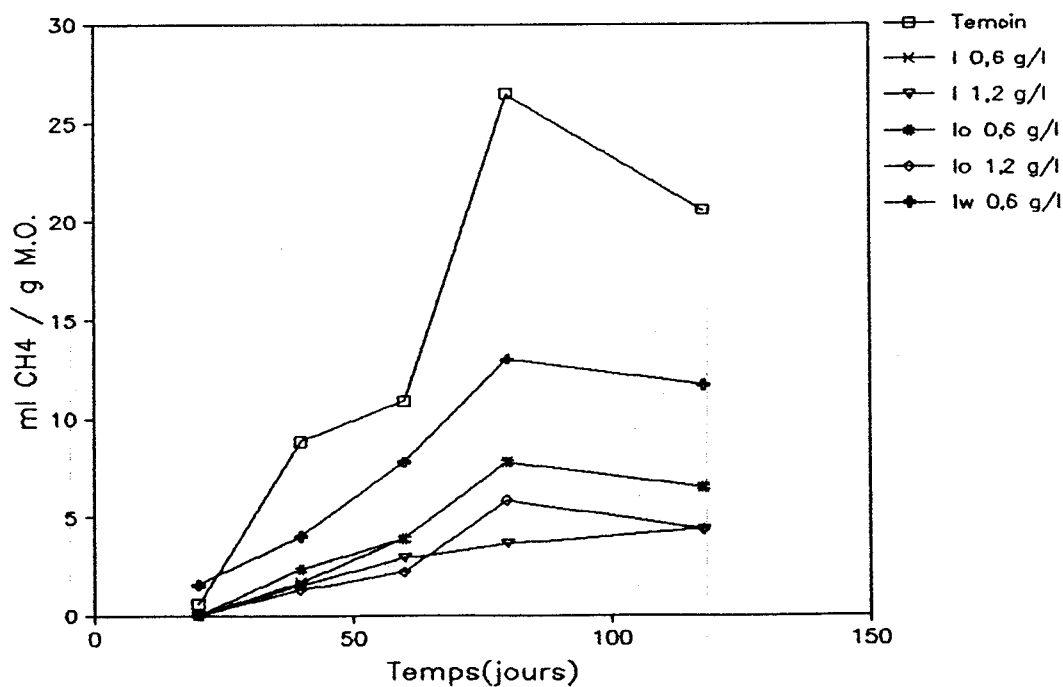


Fig. 44 : Cinétiques de production de méthane pour l'Induline à l'étape V
 [I = Induline ; Io = fraction organique de I ; Iw = fraction
 aqueuse de I]



Tableau 12a : Evolution des paramètres de dégradation à l'étape V
 Induline Westvaco
 Milieu BC réduit pH 7.8

Sucres totaux ($\mu\text{g/ml}$)						
Temps (jours)	Témoïn inoc. sans lig.	Induline totale		Induline fraction organ.		Induline fr. aqueuse 0,6 g/l
		0,6 g/l	1,2 g/l	0,6 g/l	1,2 g/l	
2	2,5	7,3	3,4	19	26,2	13,5
60	5,55	8,8	11,4	13,1	35,3	17,3
118	1,8	5,5	7,7	12,4	26,2	13,4
Lignine (D.O. 280 nm)						
2	1,776	2,21	2,7	3,97	4,08	2,74
60	1,18	1,36	1,78	3,48	3,99	2,19
118	,99	1,16	1,44	3,05	3,97	1,84

Tableau 12b : Evolution des paramètres de dégradation à l'étape V
 Lignine Kraft de paille
 Milieu BC réduit pH 7.8

Sucres totaux ($\mu\text{g/ml}$)								
Temps (jours)	Témoïn inoc. sans lig.	Lignine totale			Fraction organique		Fraction aqueuse	
		0,6 g/l	1,2 g/l	1,8 g/l	0,6 g/l	1,2 g/l	0,6 g/l	1,2 g/l
2	2,5	14,8	16	26,8	5,8	8	8,2	10
60	5,55	14,8	21,6	30,1	17,1	22,9	-	12,5
118	1,8	8,7	16	17,4	4,6	11,3	12	8,6
Lignine (D.O. 280 nm)								
2	1,776	3,17	3,8	4,07	2,7	3,75	2,57	3,18
60	1,18	2,06	3,19	3,51	1,7	2,45	1,67	2,19
118	,99	1,85	3,5	3,15	1,39	2,07	1,3	1,77

Les spectres d'absorption illustrent dans tous les cas, une réduction notable du maximum d'absorption vers 280 nm (Figure 45, page 128), ce qui se traduit en chromatographie sur gel par une réduction de taille des pics élués, surtout du deuxième pic correspondant aux oligomères de poids moléculaire plus faibles (Figures 46a et 46b, pages 129 et 130).

La chromatographie liquide de haute performance (CLHP) signale la présence au début de cette expérience de certains composés phénoliques, dont la nature n'a pas été établie car leur temps de rétention ne correspond pas à aucun de ceux des étalons des composés phénoliques monomères, utilisés pour l'étalonnage des conditions d'analyse. Par ailleurs, même si une quantification n'a pas été possible pour ces analyses, il est évident que les lignines organo-solubles contiennent davantage de phénols que celles hydro-solubles (Figures 47a, 47b et 47c, pages 131, 132 et 133).

Après la période d'incubation, la majeure partie des pics observés au début a disparu, mettant en évidence la dégradation d'une fraction de la matière organique de caractère phénolique additionnée au milieu de culture.

Un comportement très semblable à celui décrit pour les incubations contenant l'Induline comme source de carbone, a été observé dans les flacons dont le milieu de culture contenait la lignine KRAFT de paille comme substrat (Tableau 12b, page 126).

Conclusions

La solubilité variable des lignines utilisées pour ces manipulations doit être tenue en compte au moment de l'analyse des résultats, car il ne faut pas exclure la possibilité qu'une partie de la lignine insoluble au départ soit solubilisée durant l'incubation, augmentant de cette façon, les valeurs

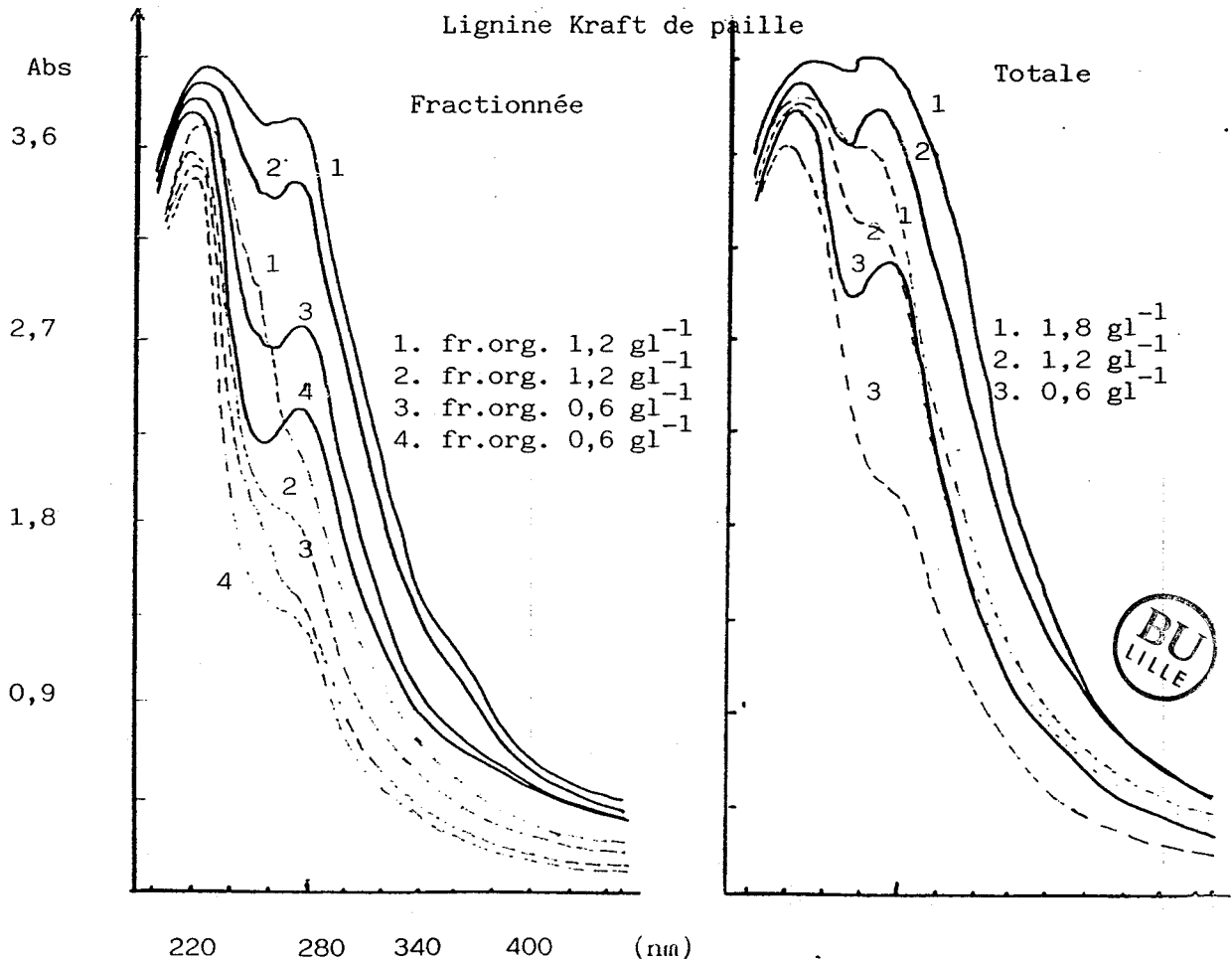
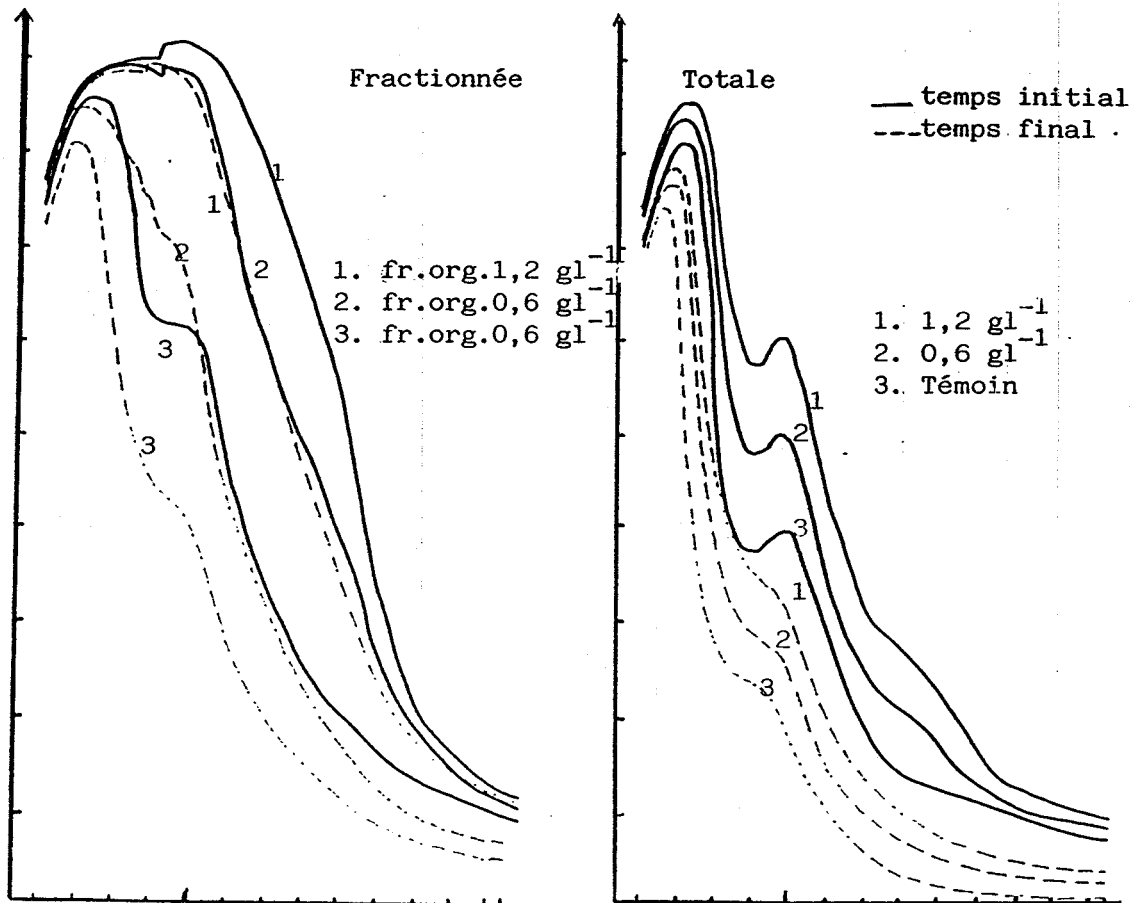
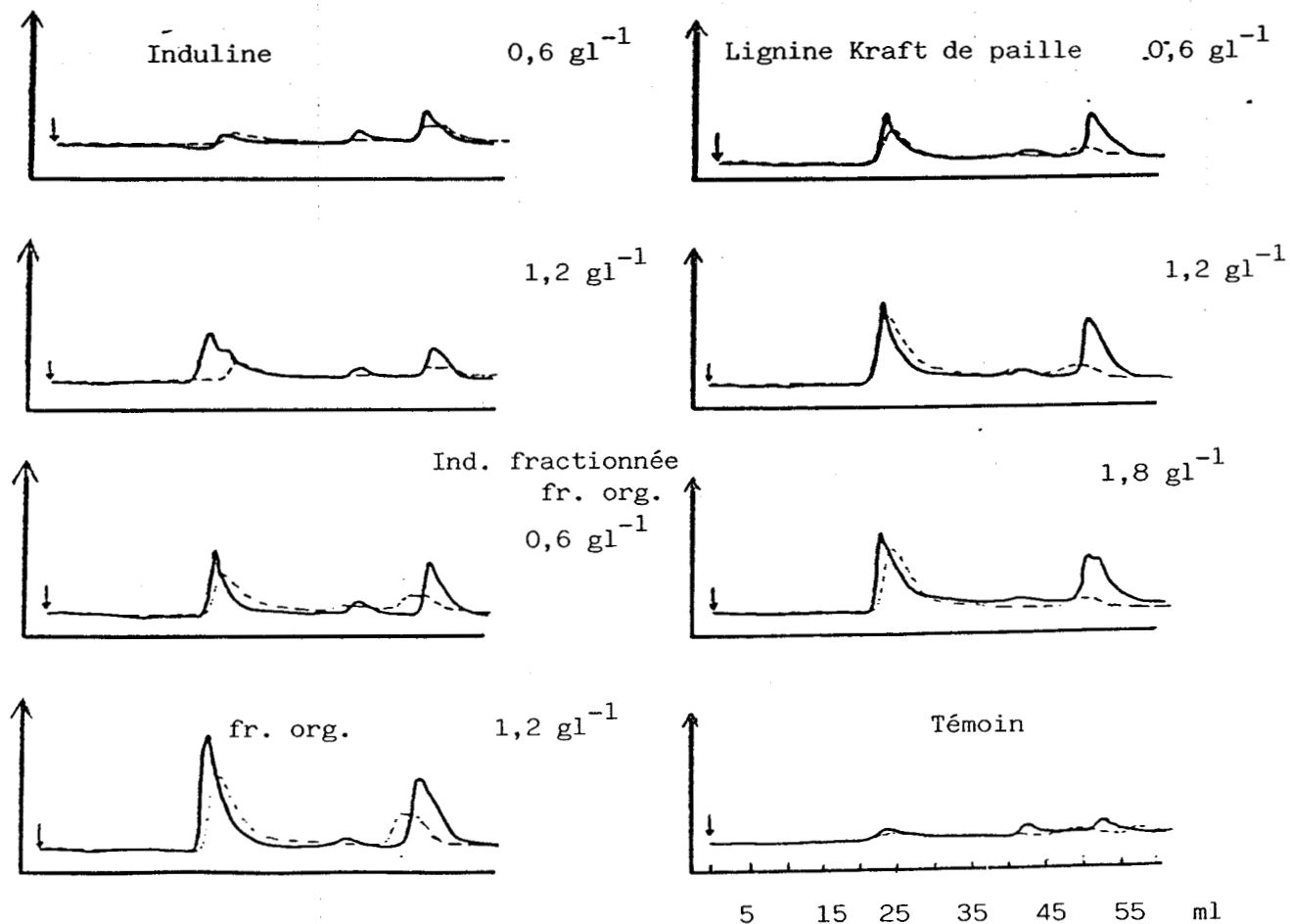


Fig. 45 : Spectres d'absorption U.V. des échantillons liquides de l'étape V



temps initial
 temps final



Fig. 46a : Chromatogrammes de perméation sur gel des échantillons de l'étape V

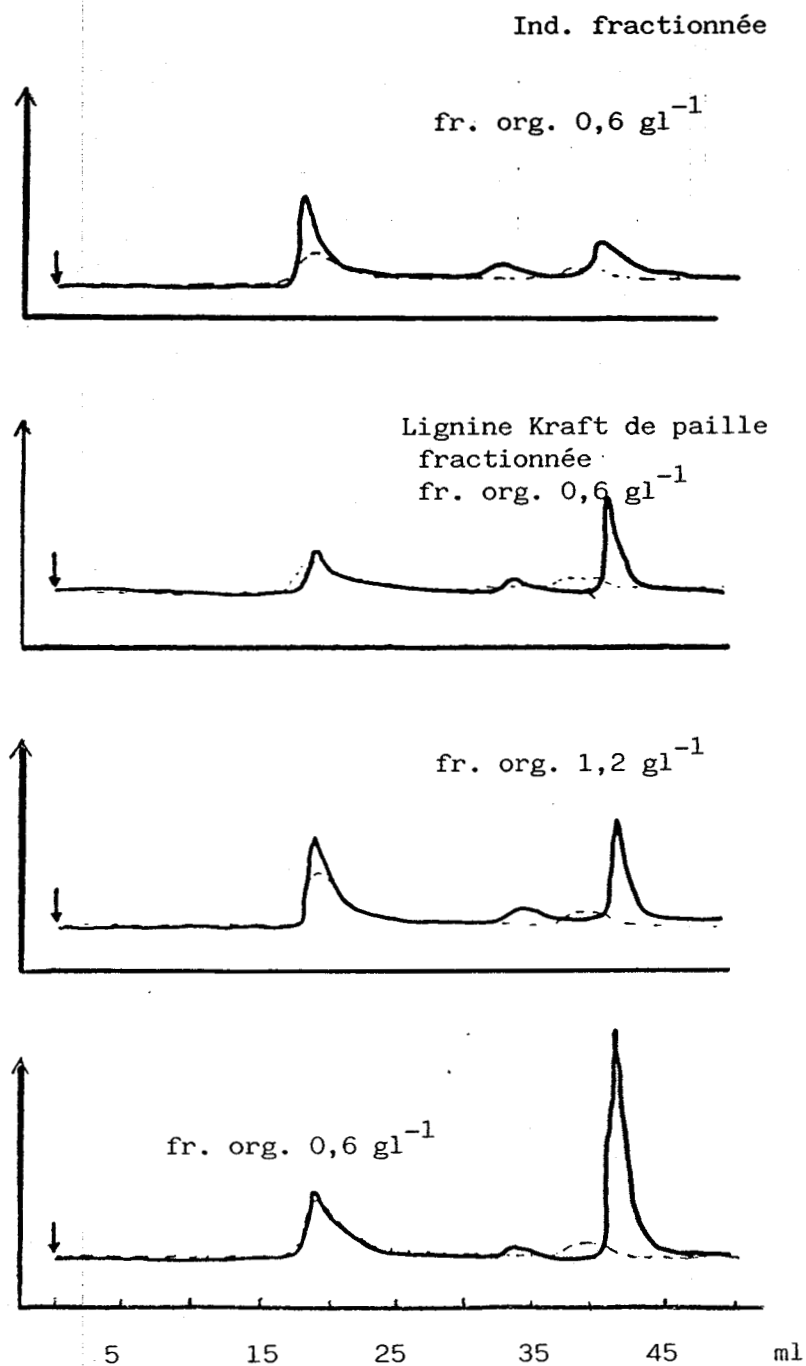


Fig. 46b : Chromatogrammes de perméation sur gel des échantillons de l'étape V (suite)

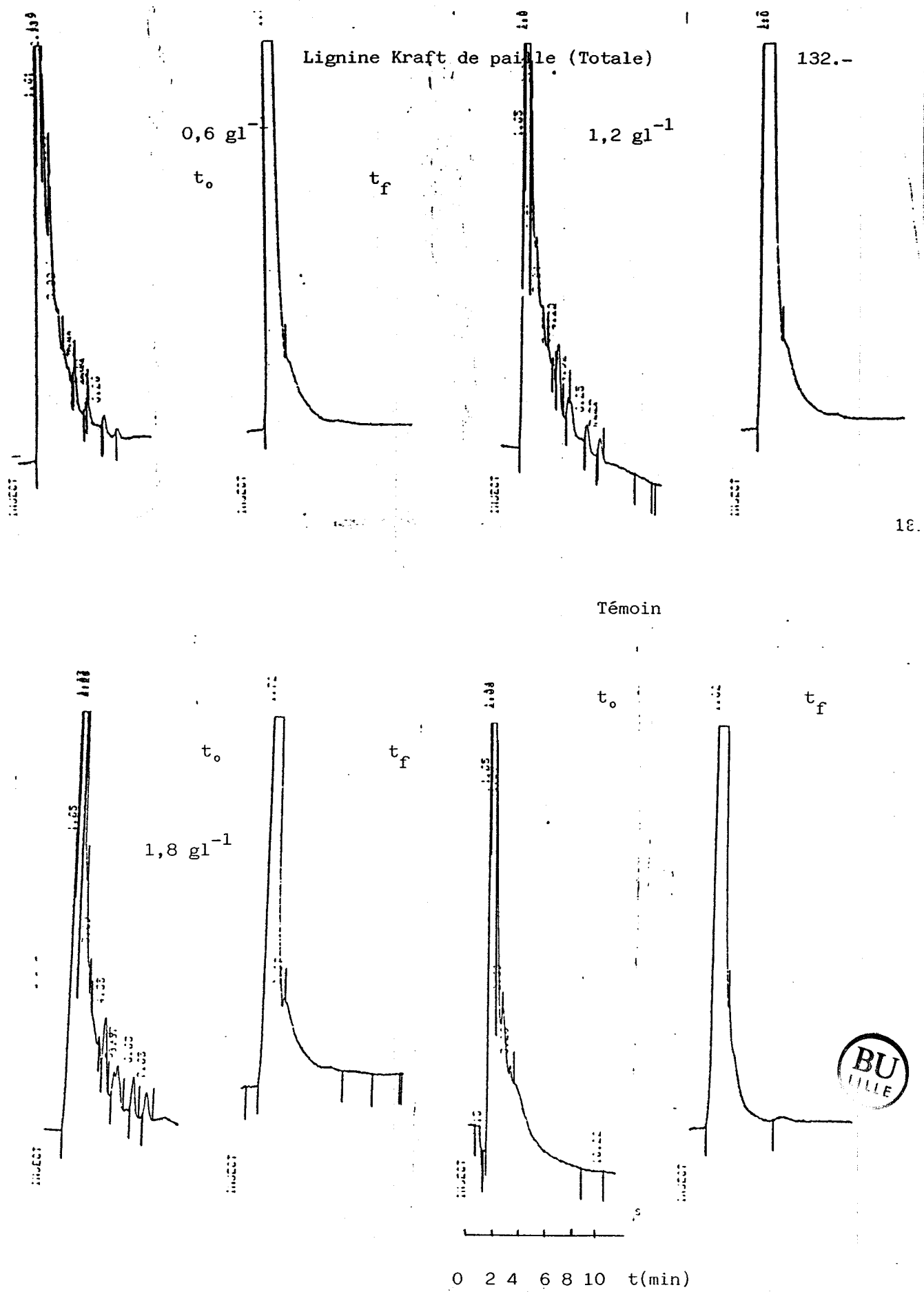


Fig. 47b : Analyse par CLHP des échantillons liquides de l'étape V (suite)

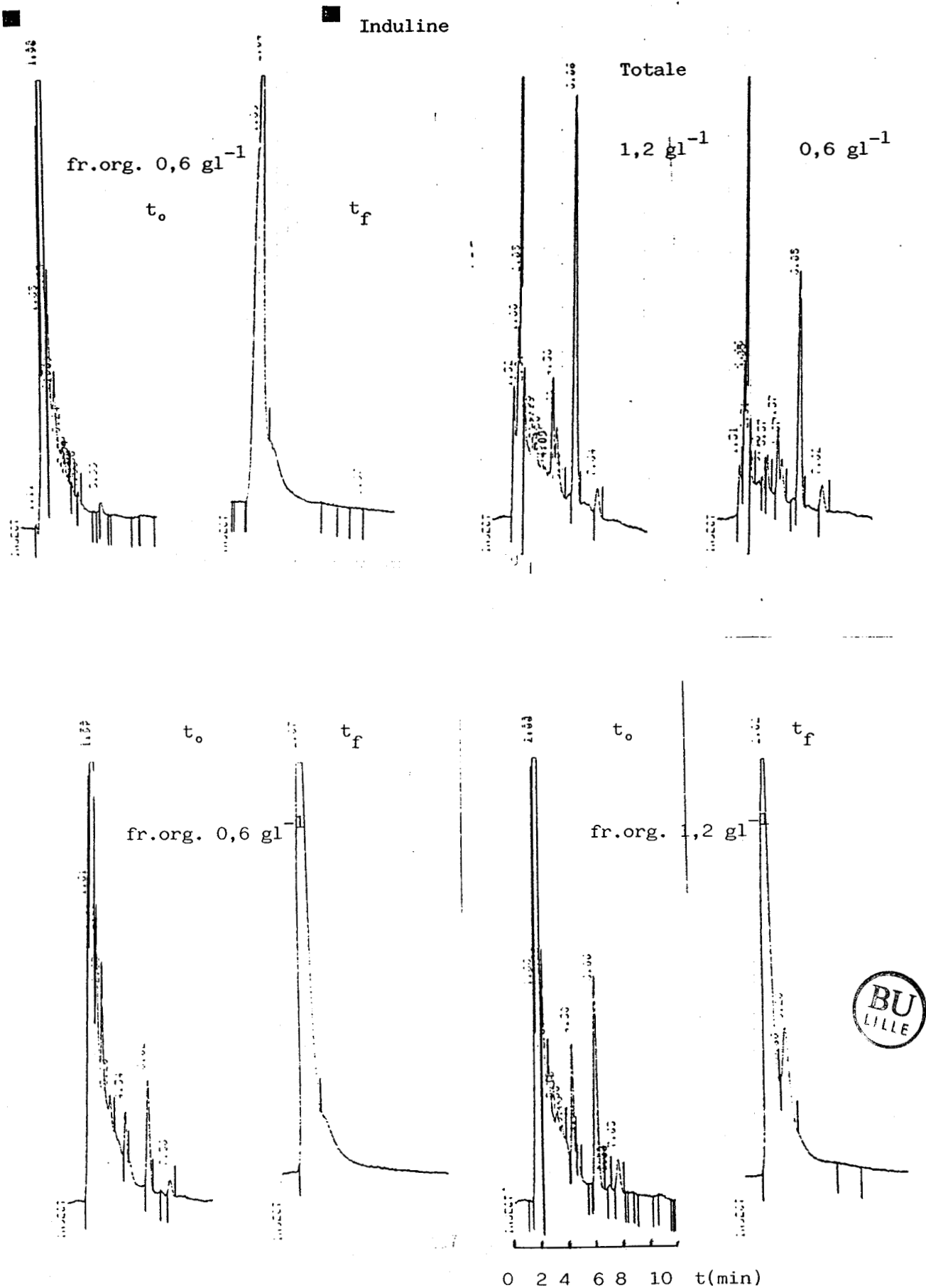


Fig. 47c : Analyse par CLHP des échantillons liquides de l'étape V (fin)

d'absorbance et modifiant aussi l'allure des chromatogrammes obtenus par chromatographie sur gel.

Ceci est important à signaler car la discussion des résultats s'élabore sur les données obtenues à partir de l'analyse de la fraction soluble des prélèvements.

D'autre part, la cinétique de l'utilisation des sucres liés à la lignine (dosés par la méthode au phénol-sulfurique) pourrait être interprétée en considérant que pendant la première partie de l'expérience (60 jours) où l'attaque microbienne sur les lignines semble être plus accentuée (ainsi que l'indiquent les valeurs d'absorbance à 280 nm), il existe une libération des sucres dans le milieu qui sont par la suite consommés en même temps qu'un ralentissement dans la vitesse de dégradation de lignine a lieu.

Finalement, la "purification" des lignines a permis d'observer l'adaptation de la culture mixte à ces nouveaux substrats (aussi bien qu'à l'Induline). En général, la fraction aqueuse est plus facilement attaquée que la fraction organo-soluble, ce qui pourrait s'expliquer par sa teneur plus élevée en sucres.

Cependant, les concentrations des sucres totaux dans les lignines de l'étude (même dans celles qui n'ont pas été purifiées) étant plutôt réduites (< 10 % poids) leur influence sur la dégradation de la lignine peut être considérée comme mineure.

CULTURE DE TRANSITION : ETAPE VI

Nous avons considéré que la croissance bactérienne observée au cours de l'étape V était faible et donc insuffisante pour servir d'inoculum dans la suite de notre travail. C'est pourquoi une série de flacons contenant le milieu BC et les deux types de lignine (lignine KRAFT de paille et induline Westvaco) directement dissoutes dans le milieu ont été préparés. Le temps d'incubation a été de 63 jours.

Observations

Une importante réduction de l'absorbance en U.V. a été observée dans ces essais, malgré un temps d'incubation relativement court.

Les oses présents dans le milieu ne semblent pas être consommés durant cette période si l'on en juge par les valeurs obtenues pour leur dosage. Une faible accumulation d'A.G.V. semble avoir lieu (Tableau 13, page 136); leur méthanisation aurait pu s'ensuivre si l'incubation en avait été poursuivie, notamment pour ceux dont la concentration en lignine KRAFT de paille était plus élevée (1 g/l) ainsi que ceux contenant l'induline (Figure 48, page 137). Ce type de lignine sera aussi utilisé dans les expériences suivantes, car l'induline Westvaco apparaît souvent comme substrat de référence dans les études de dégradation de la lignine.

Tableau 13 : Evolution des paramètres de dégradation à l'étape VI
Lignine Kraft de paille et Induline Westvaco
BC réduit pH 7.8

Sucres totaux ($\mu\text{g/ml}$)					
Temps (jours)	Lignine Kraft de paille				Induline 0,5g/l
	0,5 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1 g/l	
1	13,6	8,9	65,8	34,3	24,9
48	21	19,3	38	46,2	26
63	22,4	24,7	37	47	25
Lignine (D.O. 280 nm)					
1	4,12	4,18	4,25	4,32	4,01
48	3,48	3,6	4,02	4,02	3,94
63	3,05	3,1	3,7	3,70	3,70
A.G.V. (g/l)					
1	,1	,1	,27	,22	,02
48	,08	,11	,38	,44	,10
63	0	,02	,52	,44	,15



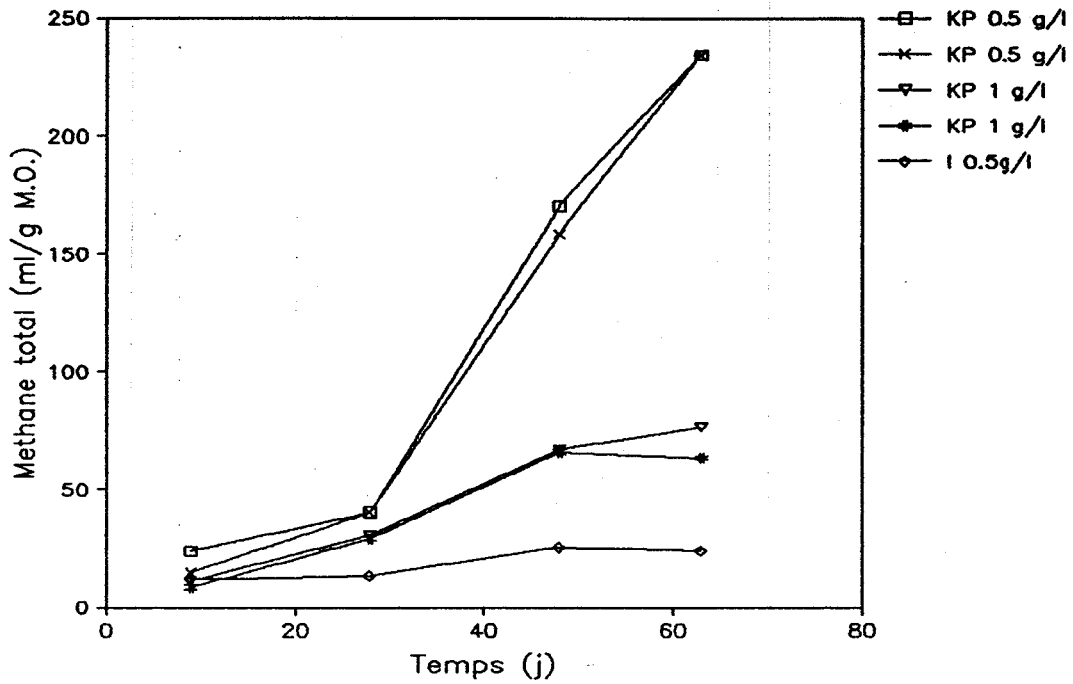


Fig. 48 : Cinétiques de production de méthane à l'étape VI

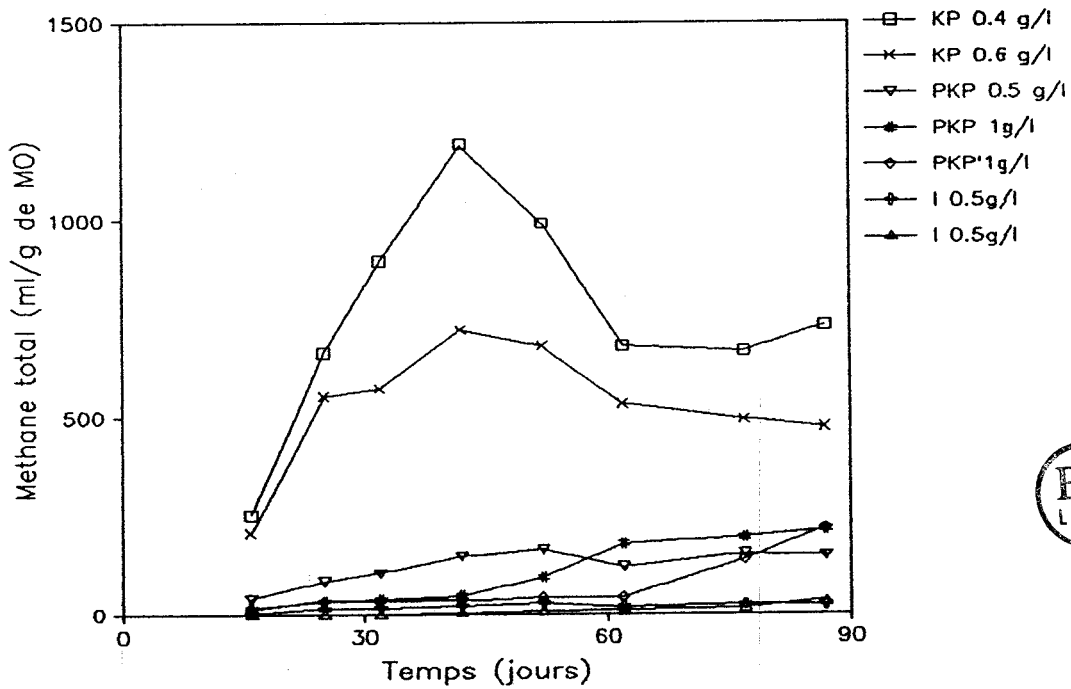


Fig. 49 : Cinétiques de production de méthane à l'étape VII



CULTURES D'ENRICHISSEMENT : ETAPE VII

Cet essai peut être considéré comme une étape d'enrichissement et de réadaptation des souches qui ont été réinoculées au long de ce travail dans des conditions différentes.

Dans cette expérience, hormis la lignine KRAFT de paille et l'induline, nous avons préparé un mélange de lignine KRAFT de paille et de lignine de paille extraite à la soude. Nous avons ainsi essayé de mettre en évidence la capacité d'adaptation de la culture mixte aux substrats lignoïdes obtenus par des procédés divers. Nous espérons de cette manière faciliter le maintien de la culture en vue de la poursuite de l'étude.

Comme dans les incubations précédentes, la lignine KRAFT de paille a été plus rapidement attaquée pendant la première phase de l'incubation (42 jours) ; par la suite, une stagnation a eu lieu (Tableau 14, page 139). Celle-ci se manifeste par une diminution de la vitesse de dégradation de la lignine mise en évidence par spectrophotométrie et gel perméation, et par un arrêt de la production de méthane.

Toutefois, dans le cas du mélange des lignines (KRAFT et soude) la phase d'adaptation semblait être plus longue, ainsi que le montrent les cinétiques de production de méthane (Figure 49, page 137) et le dosage des A.G.V. (Tableau 14, page 139). Des périodes d'adaptation encore plus prolongées sont observées pour l'induline, ce qui était prévisible étant donné la nature de la matière première d'origine (bois de pin).

La population microbienne observée au microscope est essentiellement la même quel que soit le type de lignine. Cependant, les proportions entre les différents types morphologiques représentés peuvent varier légèrement. Ainsi, dans la lignine KRAFT de paille, on observait une abondante population de cocci de tailles diverses, tandis que les bacilles apparaissaient isolés et moins abondants. En revanche, la croissance bactérienne sur induline était

Tableau 14 : Evolution des paramètres de dégradation à l'étape VII
Milieu BC réduit pH 7,8

Sucres totaux (µg/ml)							
Temps (jours)	Lignine Kraft de paille		Mélange lignine Kraft et soude de paille			Induline	
	0,4 g/l	0,6 g/l	0,5 g/l	1,0 g/l	1,0 g/l	0,5 g/l	1,15 g/l
1	81	115	140	246	257	114	198
42	51	84	106	235	242	89	305
87	5	45	32	137	124	0	114
Lignine (D.O. 280 nm)							
1	4,021	4,091	4,091	4,102	4,099	4,055	4,094
42	3,463	3,882	3,924	3,955	3,921	3,874	3,916
87	3,45	3,83	3,86	3,9	3,91	3,83	3,9
A.G.V. (g/l)							
1	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	,38	,38	,12	,07
87	,07	0	0	0	0	,25	,16

moins abondante et bacilles et cocci s'y trouvaient en proportions similaires. Certains bacilles formaient des amas.

Conclusions:

La nature du matériel lignocellulosique d'origine peut affecter la vitesse d'adaptation des microorganismes lignolytiques anaérobies. La teneur en oses des lignines utilisées semblait avoir peu d'influence sur la cinétique de l'utilisation de la lignine. Néanmoins la présence d'oses pourrait favoriser l'activité méthanogène.

COMPARAISON ENTRE LES ETAPES IV A VII

Les étapes où nous avons utilisé un milieu dépourvu d'extrait de levure et de tryptone (BC) présentent un environnement identique pour la croissance des microorganismes, et permettent donc de comparer les cinétiques de dégradation de la lignine et de méthanogénèse.

On remarque l'importance, déjà signalée par ailleurs, de la solubilité de la lignine lors des essais de dégradation. Ainsi, pour l'étape V, la lignine avait été ajoutée après stérilisation au milieu de culture à partir d'une solution concentrée et la solubilité finale dans le milieu était assez réduite par rapport à celle observée pour les autres essais où la lignine était stérilisée une fois incorporée au milieu. Cette diminution de solubilité du substrat provoque la réduction du volume de méthane produit. Par ailleurs la fraction de lignine solubilisée dans cet essai était assez sensiblement dégradée, aussi bien pour la lignine KRAFT de paille que pour l'Induline AT (Tableau 15, page 142).

Une adaptation semble avoir lieu lors du passage d'une étape à la suivante ainsi que l'indiquent les variations d'absorbance U.V. (Tableau 15, page 142). La relation entre les cinétiques d'utilisation des sucres, la méthanogénèse et la variation d'absorbance U.V. apparaissent au Tableau 15, page 142. Apparemment, une utilisation rapide des sucres conduit à une production de méthane plus forte, et en même temps à un ralentissement de la vitesse de dégradation des lignines (Tableau 15, page 142). D'autre part, la méthode de préparation de la lignine semble aussi influencer les cinétiques de culture, car le mélange de lignines soude et KRAFT de paille avaient des vitesses de dégradation différentes de celles de la lignine KRAFT de paille seule. Ceci pourrait aussi être attribué au fait que le mélange semble contenir plus de sucres que lignine KRAFT.

La lignine de référence Induline AT Westvaco présente des cinétiques

Tableau 15: Comparaison entre les différentes étapes IV à VII

Lignine Kraft de paille

Etape n°	Concentr. lignine (g.l ⁻¹)	Temps incub. (jours)	Absorbance à 280 nm		Sucres tot. (mg/l ['])		Production de méthane (ml/l de M.O.)
			t ₀	t _x	t ₀	t _x	
IV	0,3	115	3,04	2,5	206	14	178
IV	0,6	115	4,20	4,0	452	36	257
V	0,6	118	3,17	1,85	14,8	8,7	19,5
V	1,2	118	3,8	3,5	16	16	24,0
VI	0,5	63	4,12	3,0	13,6	24	234,3
VI	1,0	63	4,25	3,7	65,8	37	76
VII	0,3	87	4,02	3,4	81	5	730
VII	0,6	87	4,09	3,8	115	45	472

Lignine Kraft et soude de paille

Etape n°	Concentr. lignine (g/l ['])	Temps incub. (jours)	Absorbance à 280 nm		Sucres tot. (mg/l ['])		Production de méthane (ml/g de M.O.)
			t ₀	t _x	t ₀	t _x	
VII	0,5	87	4,09	3,8	140	32	147
VII	1,0	87	4,10	3,9	246	137	214

Induline AT (Westvaco)

Etape n°	Concentr. lignine (g/l ['])	Temps incub. (jours)	Absorbance à 280 nm		Sucres tot. (mg/l ['])		Production de méthane (ml/g de M.O.)
			t ₀	t _x	t ₀	t _x	
V	0,6	118	2,21	1,16	7,3	5,5	6,5
V	1,2	118	2,7	1,44	3,4	7,7	4,4
VI	0,5	63	4,01	3,7	25,0	25,0	24
VII	0,5	87	4,05	3,8	114	0	22
VII	1,15	87	4,09	3,9	198	114	16

t₀ = temps zéro ; t_x = temps final



semblables pour toutes les étapes comparées. Toutefois les différences entre les cinétiques sont moins marquées que pour les lignines de paille, probablement à cause de de la plus forte teneur en sucres de ces dernières.

ESSAI DE DEGRADATION DANS UN MILIEU NON TAMPONNE POUR L'ETUDE EN RMN : ETAPE VIII

Plusieurs séries d'enrichissements ont été réalisées dans du milieu BC tamponné à l'HEPES. Au cours d'un de ces essais des échantillons ont été préparés pour effectuer des analyses de lignine par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (voir protocole Figure 50, page 145). Les spectres ainsi obtenus montraient une interférence importante due à la présence d'HEPES qui se trouvait en concentration supérieure à la lignine et provoquait des massifs considérables sur les spectres RMN masquant le faible signal des lignines. Pour éliminer cette interférence, nous avons décidé de réaliser plusieurs modifications dans les conditions de culture. Parmi ces changements, il faut surtout souligner la suppression de l'HEPES du milieu. Il faut noter que ceci constituait une altération capitale dans l'environnement des bactéries car faute du pouvoir tampon de l'HEPES, le pH du milieu de culture était plus sensible aux variations provoquées par l'activité microbienne et même par la possible solubilisation de certains composés (tels les acides phénoliques) du substrat comme résultat d'une incubation prolongée.

D'autre part, la concentration de lignine dans le milieu a été portée à 6 g/l afin de pouvoir compter, à la fin de l'expérience sur une quantité de lignine résiduelle suffisante pour la réalisation des analyses en RMN.

La possibilité d'une inhibition de la croissance des micro-organismes ou d'une modification dans les cinétiques, soit méthanogène ou ligninolytique, comme résultat des modifications signalées auparavant ne peut également pas être négligée.

Le Tableau 16 (page 146) montre les résultats des observations effectuées au cours de l'incubation. La production de méthane (en ml CH_4 /g M.O.) apparaît considérablement réduite par rapport à celle obtenue dans les

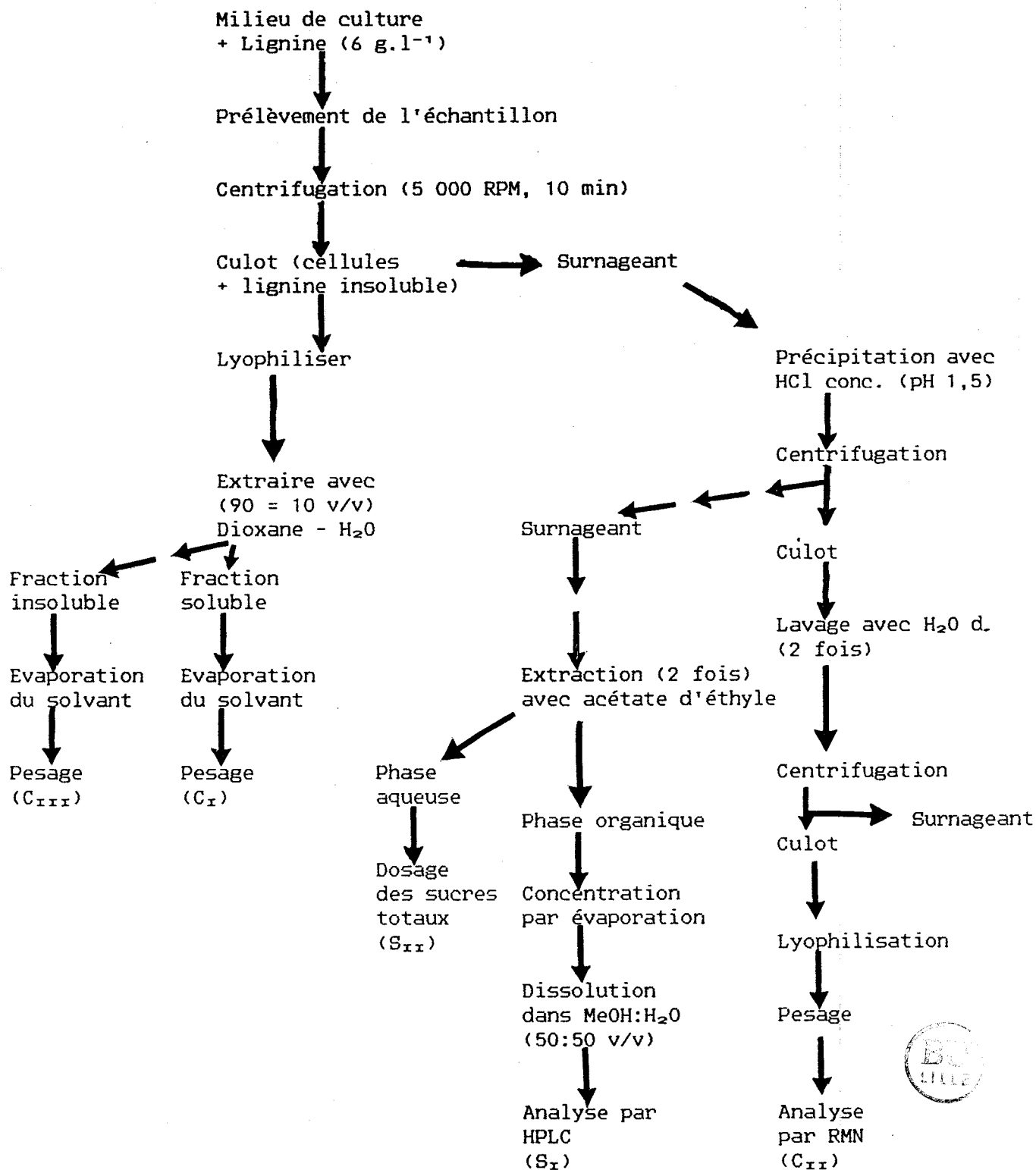


Fig. 50 : Protocole de fractionnement des échantillons pour l'analyse en RMN

Tableau 16 : Evolution des paramètres de dégradation à l'étape VIII
Milieu BC réduit pH 7.8 (50 ml par flacon 300 mg M.O.
/flacon)

Sucres totaux (µg/ml)							
Temps (jours)	PKP	KP	KP non inoc.	Indul. (1)	Indul. (2)	Indul. non inoc.	BC inoc.
1	400	550	750	308	305	327	0
36	113	205	580	143	132	140	0
69	90	267	520	169	173	240	0
Lignine (D.O. 280 nm)							
1	3,99	4	3,99	3,99	3,99	3,99	,35
36	3,99	4	4	4	4	4,01	0
69	4,35	4,4	4,4	4,34	4,39	4,34	0
A.G.V. (g/l)							
1	0	0	0	0	0	0	0
36	,28	,23	0	,01	,01	0	0
69	,47	0	0	0	0	0	0

KP = Lignine Kraft de paille

PKP = Lignine Kraft de paille + lignine soude de paille

Indul. = Induline Westvaco



flacons utilisés pour préparer l'inoculum (Figure 51, page 148; comparer à la Figure 49, page 137). Le mélange des lignines (soude et KRAFT) de paille produit davantage de méthane comme conséquence probablement de l'utilisation plus importante des sucres. En ce qui concerne la dégradation de la lignine, les deux mesures réalisées au cours de l'expérience montrent au départ une presque immobilité des valeurs d'absorbance pendant la première moitié de l'incubation tandis que pendant la phase suivante il y a une augmentation dans l'absorbance à 280 nm et à 310 nm. En même temps, on observe une consommation accrue des sucres durant la phase initiale tandis que celle-ci semble plafonner au cours de la seconde partie de l'incubation. Dans les flacons où l'Induline a été ajoutée en tant que source de carbone, il n'y a pas de production de méthane après 60 jours d'incubation. En revanche, la même cinétique que pour les essais contenant de la lignine de paille s'observe dans ces flacons par rapport aux mesures de dégradation de lignine (absorbance dans l'U.V.) et consommation des sucres.

Le protocole de préparation des échantillons pour l'analyse par RMN indique qu'on obtient plusieurs fractions différentes à partir de l'échantillon de départ. Une seule de ces fractions (C_{II}) était destinée à la RMN et les autres fractions ont donc été analysées par les mêmes techniques que celles utilisées tout au long de cette étude.

Les résultats ainsi obtenus sont transcrits dans le Tableau 17 (page 149). La pesée des fractions C_{II} au début et à la fin de la période d'incubation indique une réduction de la fraction soluble précipitable à l'acide. En revanche, la partie organo-soluble S_x (Figure 50, page 145) semble augmenter à en juger par les valeurs d'absorbance au temps initial et au temps final. L'inverse serait vrai pour la fraction soluble dans l'eau (S_{II}) où une diminution en absorbance est mise en évidence après la durée d'incubation. Ceci pourrait être interprété comme la conséquence d'une dépolymérisation de la lignine conduisant à une libération dans le milieu d'oligomères ou des acides phénoliques monomères qui seraient par la suite récupérés dans

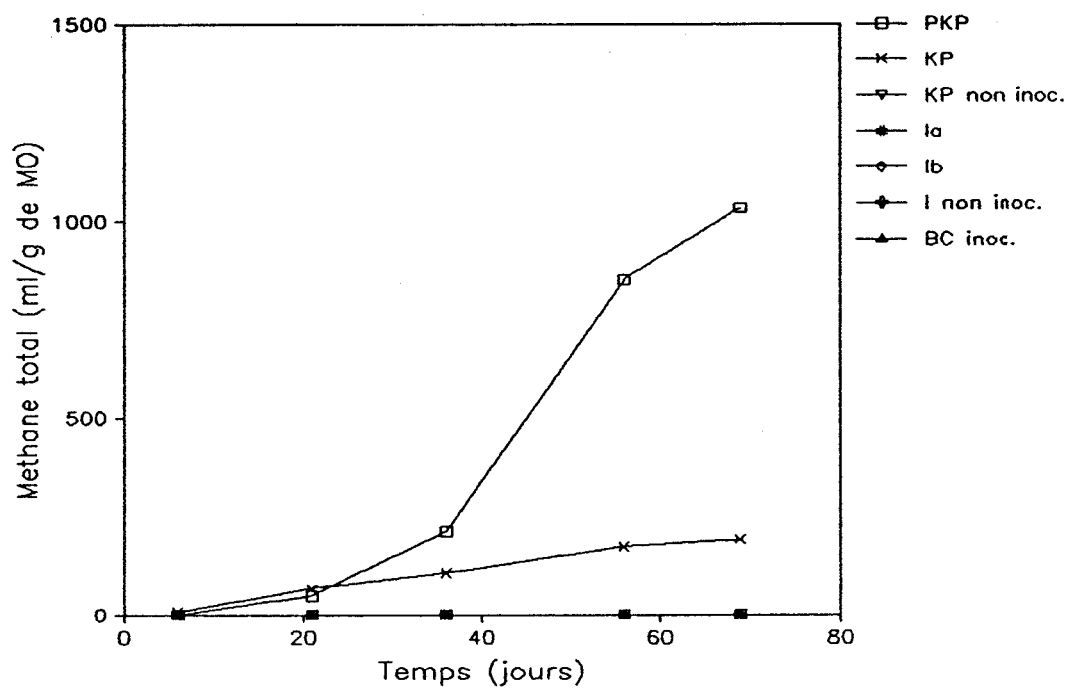


Fig. 51 : Cinétiques de production de méthane à l'étape VIII



Tableau 17: Fractionnement des échantillons pour la R.M.N.

Type de lignine	Fraction Ia (g/l)		Perte pondérale fraction Ia	Absorbance à 280 nm			
				Fraction S _I		Fraction S _{II}	
	t _o	t _r	%	t _o	t _o	t _r	t _r
PKP	2,5	1,925	24,2	3,9	2,09	4,34	1,4
KP ₁	3,9	3,4	13	3,92	1,36	4,35	1,14
KP ₂	3,7	4,55	0	3,9	2,17	4,36	1,24
I ₁	1,6	1,55	3,2	3,9	1,34	4,33	1,05
I ₂	1,6	1,5	6,2	3,9	1,46	4,38	1
I ₃	1,8	1,175	2	3,9	1,46	4,31	1,35

Fraction Ia = Fraction insoluble après acidification du surnageant de culture
 Fraction S_I = Fraction organosoluble du surnageant de la précipitation acide
 Fraction S_{II} = Fraction aqueuse (résidu aqueux du surnageant après extraction par le solvant organique)

PKP = Mélange de lignines Kraft et soude de paille

KP = Lignine Kraft de paille

I = Induline Westvaco

t_o = temps zéro ; t_r = temps final



l'acétate d'éthyle au moment de l'extraction et qui donneraient un accroissement de l'absorbance dans l'U.V.

Les analyses en CLHP montraient un grand nombre de composés phénoliques dans les échantillons de départ pour tous les types de lignine. En revanche, à la fin de l'incubation, les échantillons des flacons contenant des lignines de paille montrent une augmentation de la fraction non retenue et l'affaiblissement ou disparition de certains pics observés pour les échantillons du début. Ceci est aussi valable pour les essais dans lesquels l'Induline fut ajoutée comme substrat. Toutefois, les variations dans l'allure des chromatogrammes sont moins marquées. Le témoin présente aussi certaines modifications dues probablement aux interconversions entre composés phénoliques (Figures 52a et 52b, pages 151 et 152).

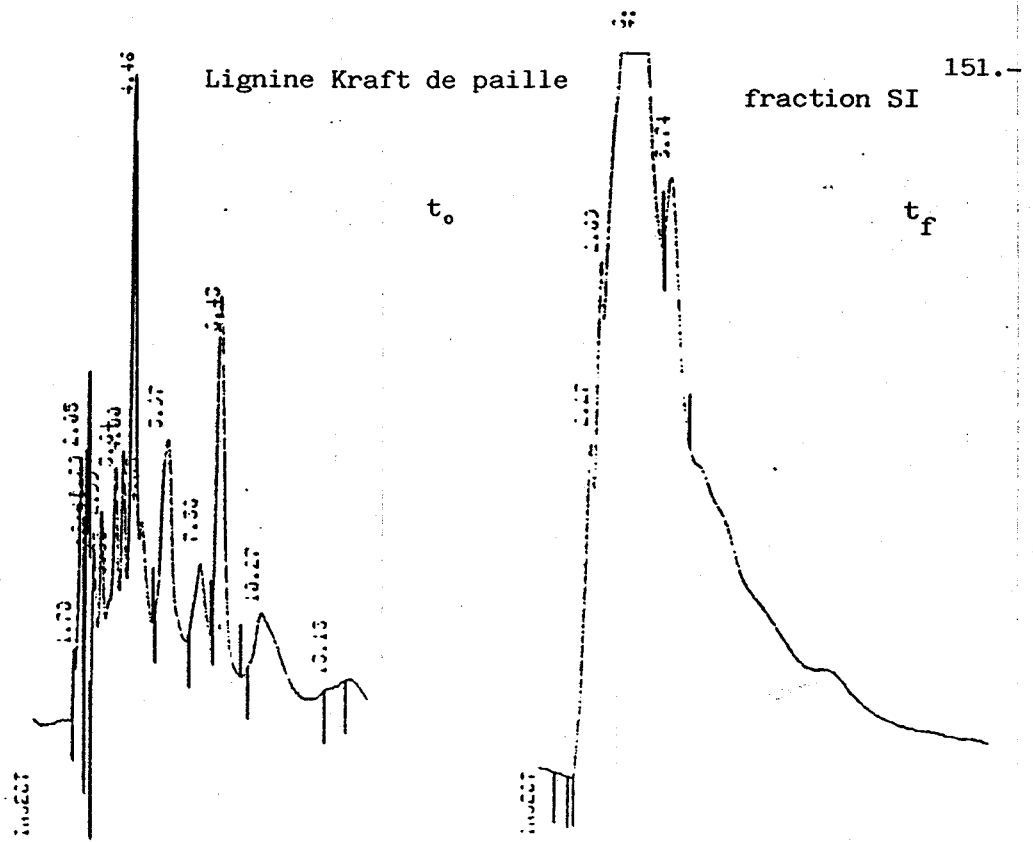
Observations :

Les modifications induites dans l'environnement de cette série d'essais ont entraîné une altération des cinétiques de croissance et de capacité de dégradation des lignines des cultures mixtes adaptées, tel que le montraient les résultats présentés auparavant.

Malgré ces perturbations, l'observation au microscope a indiqué que les cultures ont néanmoins poussé. Ainsi, s'il y a eu une certaine inhibition, elle n'a pas été complète et un temps d'incubation plus prolongé aurait pu éventuellement permettre aux bactéries de se réadapter aux nouvelles conditions donnant lieu à des modifications plus remarquables dans les structures des lignines.

SUIVI DE LA DEGRADATION DES LIGNINES PAR ANALYSE EN RMN

Etant donné que les concentrations de lignine dans les essais initiaux étaient trop faibles pour fournir des échantillons pour la RMN, une



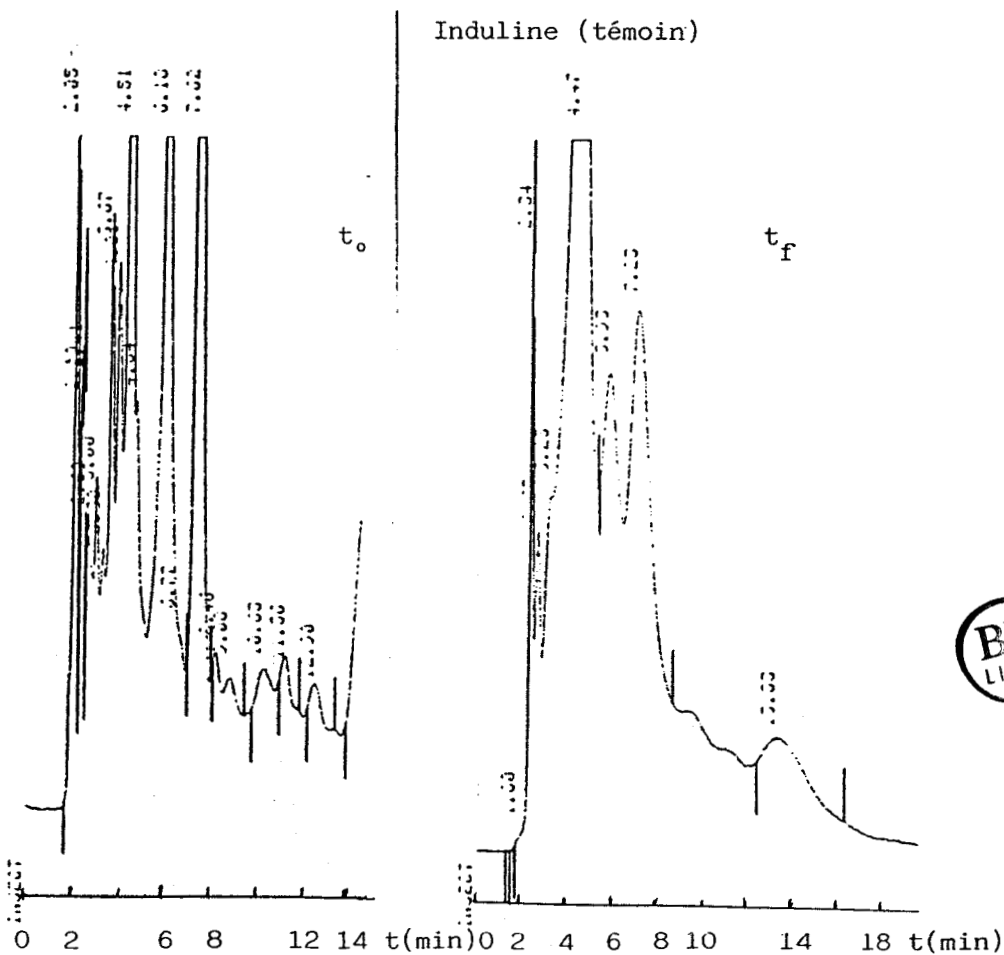
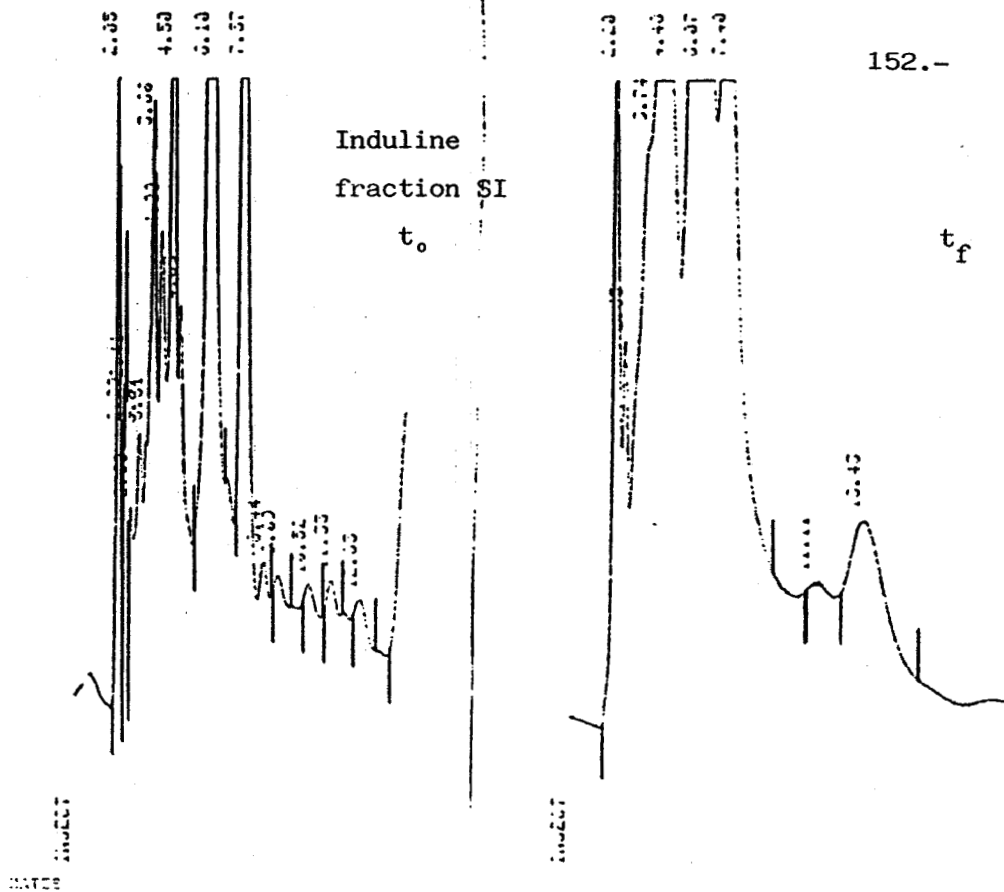


Fig. 52b : Analyse par CLHP des fractions de l'étape VIII (suite)

série d'essais ont été réalisés afin de disposer d'une quantité suffisante de lignine résiduelle pour effectuer ces analyses. Nous espérons que l'utilisation de la RMN pour le suivi de la dégradation pourrait nous apporter plus de précisions sur les modifications chimiques et structurales des lignines au cours des incubations.

Il est évident que la fraction nommée C_{II} sur le schéma était celle qui avait le plus d'intérêt pour l'analyse en RMN car c'est la partie correspondant à la Lignine soluble et donc plus accessible à l'attaque microbienne.

Selon HALUK *et al.* (1978), trois domaines bien distincts caractérisent les atomes de carbone des principales unités de la lignine.

Atomes de carbone rattachés aux CO (entre 230 et 165 ppm)

- . Signal 3' (carboxyles à 166,5 ppm)
- . Signal 3" (162,42 ppm) non attribué)

Atomes de carbone aromatiques et éthyléniques (entre 165 et 105 ppm)

Unités syringyles (S)

- Carbones C₃ et C₅
 - . Signal 5 (153,5 ppm) = C 3/5 des unités étherifiées (très intense)
 - . Signal 8 (148,2 ppm) = C 3/5 des unités libres (moyen)
- Carbones C₁ et C₄
 - . Signal 11 (138,8 ppm) (C₁ et C₄ unités étherifiées)
 - . Signal 12 (135 ppm) (C₄ unités libres)
 - . Signal (134 ppm) (C₁ unités libres)
- Carbones C₂ et C₆
 - . Signal 24 : C₂ et C₆ unités étherifiées et libres (intense).

A noter que les signaux 5 et 24 sont caractéristiques des

feuillus (hêtre, peuplier), mais ils sont absents des conifères (véritable fingerprint).

Unités guaiacyles (G)

- Carbones 1 et 4
 - . Signal 7 (150 ppm) = C₄ des unités étherifiées (moyen)
 - . Signal 9 = C₄ des unités libres
 - . Signal 12 (135,1 ppm) = C₁ des unités étherifiées (faible)
 - . Signal 14 = C₁ des guaiacycles avec α -C ou α -CH₂
- Carbone 3
 - . Signal 8 (148 ppm) = C₃ des unités libres
 - . Signal 7 (150 ppm) = C₃ des unités étherifiées avec α -CO
- Carbone 5
 - . Signal 20 (115,7 ppm) = C₅ des unités libres (comme dans le guaiacol) (très intense)
- Carbone 6
 - . Signal 18 (119,9 ppm) = C₆ des unités libres (intense)
 - . Signal 17 (121,7 ppm) = C₆ des unités étherifiées avec α -CO
- Carbone 2
 - . Signal 22 = C₂ des unités libres
 - . Signal 21 = C₂ des unités avec α -CO ou α -CH₂ (moyen)

Unités parahydroxyphényles (PHP)

- Carbone 1
 - . Signal 13 - PHP libre (faible)
- Carbones 2 et 6
 - . Signal 16 (128,7 ppm)
- Carbones 3 et 5
 - . Signal 20 (115,7 ppm) PHP libre. L'intensité de ce signal est déterminée par le C₅ des unités guaiacycles.

- Carbone C₄

- . Signal 3" (161,7 ppm), unités PHP étherifiées
- . Signal 4 (158 ppm), unités PHP libres

Atomes de carbone des structures aliphatiques saturées (entre 0 et 100 ppm)

- . Signal 34 (56,5 ppm) (le plus intense) = groupements -OCH₃
- . Signaux 26, 31 et 33 = atomes de carbone respectivement C_β, C_α et C_γ correspondant aux unités β-aryléthers
- . Signal 32 (63,5 ppm) = C_γ des unités phénylcoumaranes et C_β, C_γ des unités β-dilignoles
- . Signal 30 (75 ppm) = C_γ des unités β-dilignoles
- . Signal 25 (88,2 ppm) = C_α des unités phénylcoumaranes

Selon HALUK *et al.* (1978), l'utilisation de la RMN du ¹³C constitue la meilleure méthode pour élucider la structure d'une macromolécule aussi complexe que la lignine. Plus que toute autre méthode d'analyse spectrale, elle fournit à elle seule plus de détails sur la constitution chimique de cette substance.

Les spectres de RMN obtenus pour les échantillons des essais de dégradation de lignine sont présentés dans les figures suivantes :

La lignine KRAFT de paille (Figure 53, page 157) montre un massif entre 28,46 et 28,87 ppm qui peut correspondre aux groupements CH₂ (méthyle) dans les ramifications alkyl. A 56,02 ppm, résonance des groupements méthoxyles de la lignine. Les pics situés entre 60 et 105 ppm appartiennent aux sucres attachés à la lignine. La région de 105 à 155 ppm, dont l'agrandissement apparaît sur la Figure 54 (page 158) correspond à la partie aromatique.

Le pic à 40 ppm est celui du solvant diméthyl sulfoxyde (DMSO). Sur le spectre de la lignine KRAFT de paille, utilisée comme témoin (Figure 55, page 159), on remarque à 28 ppm un pic plus intense que dans le spectre de la

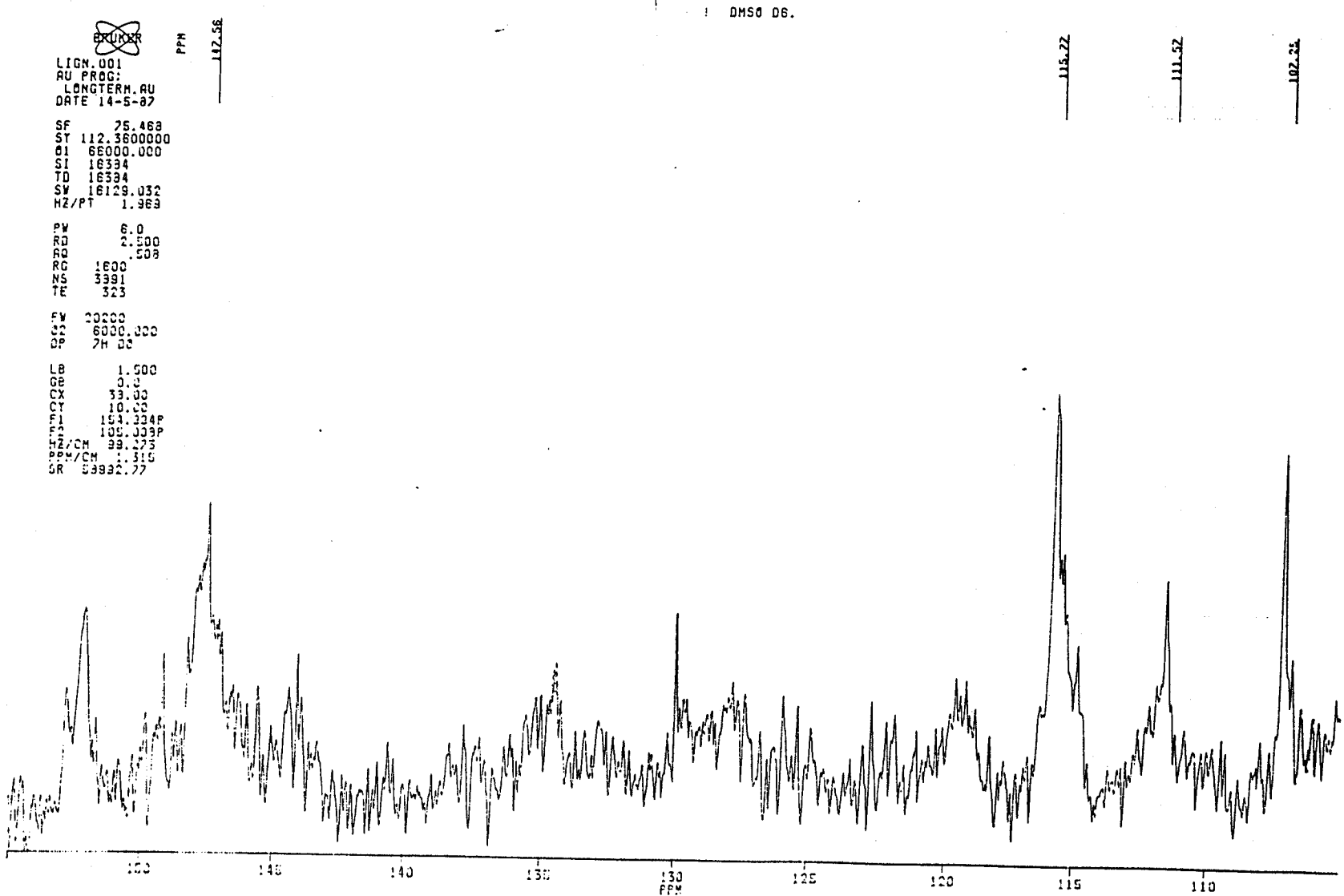
lignine KRAFT de paille inoculée (Figure 56, page 160). De même, pour le pic correspondant aux groupements méthoxyle à 55,98 ppm, le signal est plus important dans le cas de la lignine incubée mais non inoculée. Pour ce qui concerne les carbones α , β et des ramifications des unités phénoliques de la lignine, une différence est aussi à signaler entre la lignine de paille témoin et inoculée. La partie aromatique des échantillons de lignine de paille analysés n'apparaît pas très nette sur les spectres, néanmoins, une modification semble avoir lieu surtout dans la région 145-150 ppm ainsi que pour le pic situé à 152 ppm.

Il faut signaler que pour les lignines incubées et extraites pour analyses, on ne retrouve plus les pics de sucres qui apparaissaient sur le spectre du produit original. Ceci est dû probablement à la procédure d'extraction en vue de l'analyse RMN qui sépare les oses en les solubilisant.

Pour la lignine commerciale (Induline Westvaco) le spectre du produit original est montré sur la Figure 57 (page 161). Ces échantillons ne présentent pas de sucres. En revanche les massifs dans la région des aromatiques apparaissent plus nettement dégagés de la ligne de base, ainsi que les carbones α , β et γ (Figure 58, page 162).

La comparaison entre les fractions aromatiques de l'Induline d'origine et celle incubée avec les micro-organismes (Figure 59, page 163) indique une légère modification à 145,22 ppm, qui pourrait correspondre à un C_2 ayant un CH_2 en α dans le catéchol (HEMMINGSON, 1983). A 125,6 ppm, il y a apparition d'un massif sur le spectre de la lignine incubée (Figure 60, page 164) qui n'existait pas dans le spectre de la lignine d'origine, en même temps qu'une diminution du massif à 128,7 ppm dans le spectre de lignine incubée. Ce massif peut correspondre à des C non substitués des noyaux aromatiques du type C_5 , C_6 ou C_7 avec ramification insaturée en 5-5.

Fig. 54 : Agrandissement de la région des aromatiques du spectre RMN de la lignine KRAFT de paille d'origine



~~BRUNER~~
 LIGN.001
 RU PROC:
 LONGTERM.RU
 DATE 14-5-87
 SF 25.463
 ST 112.3800000
 SI 66000.000
 SP 16334
 SD 16334
 SW 16129.032
 SZ/PT 1.463
 MR 6.0
 RG 2.000
 GR 0.000
 SR 1600
 SZ 3391
 ST 323
 M 10000
 W 10000
 K 10000
 H 10000
 J 1.500
 B 0.000
 O 0.000
 X 0.000
 U 0.000
 L 0.000
 I 0.000
 C 0.000
 H 0.000
 N 0.000
 O 0.000
 S 0.000
 P 0.000
 Q 0.000
 R 0.000
 T 0.000
 Y 0.000
 Z 0.000
 CR 3392.77



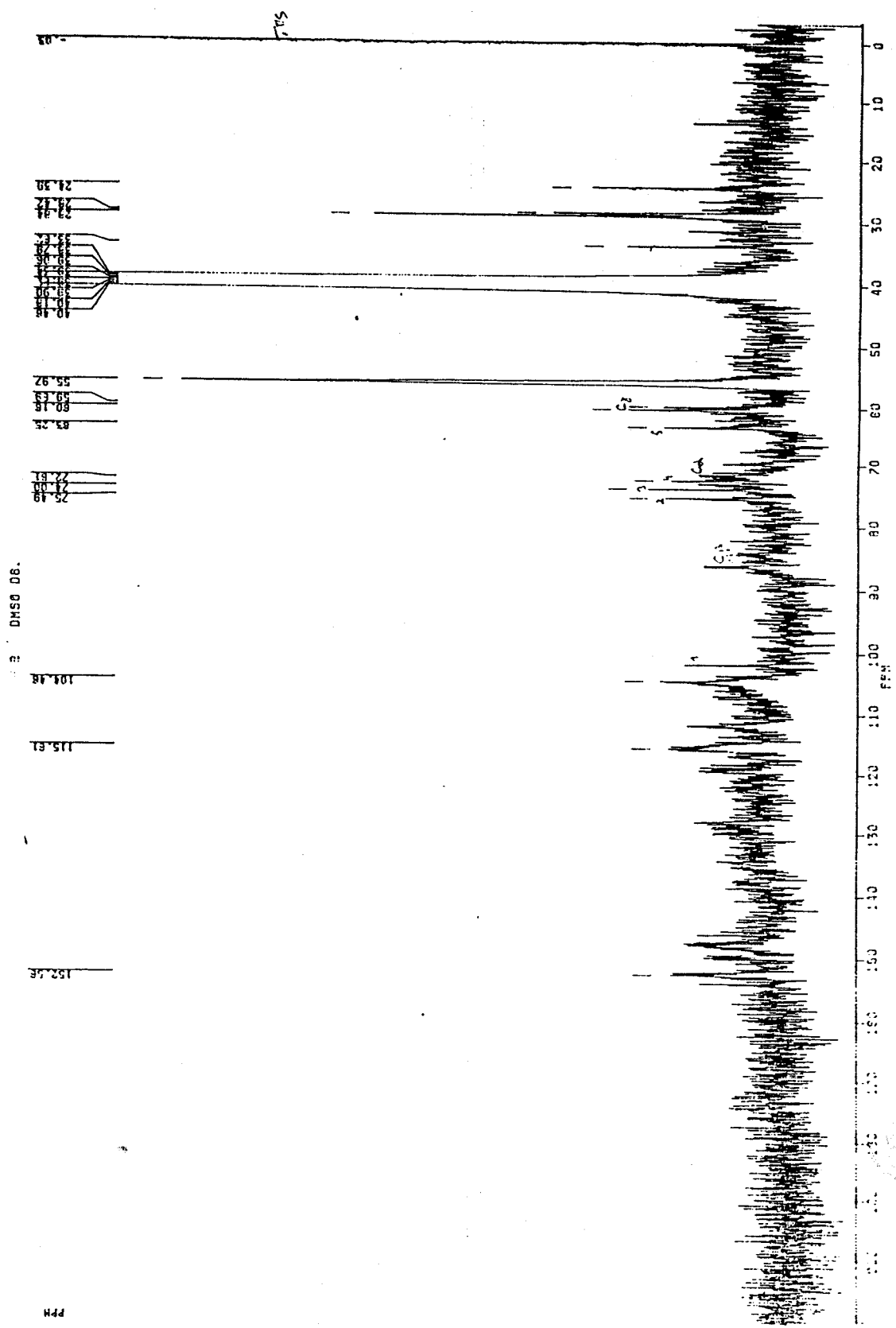
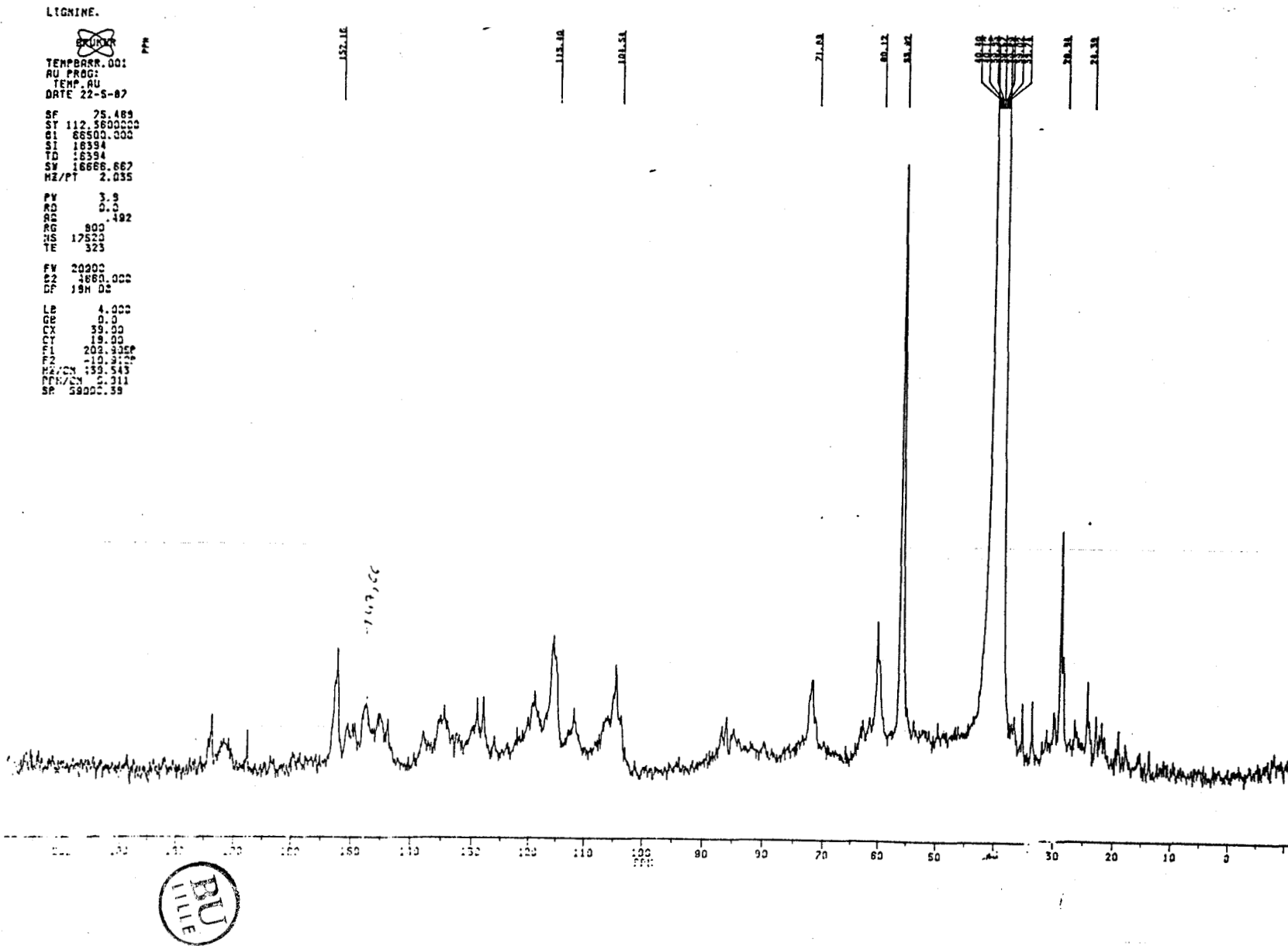


Fig. 55 : Spectre RMN de la lignine KRAFT de paille incubée non inoculée

Fig. 56 : Spectre RMN de la lignine KRAFT de paille après action microbienne



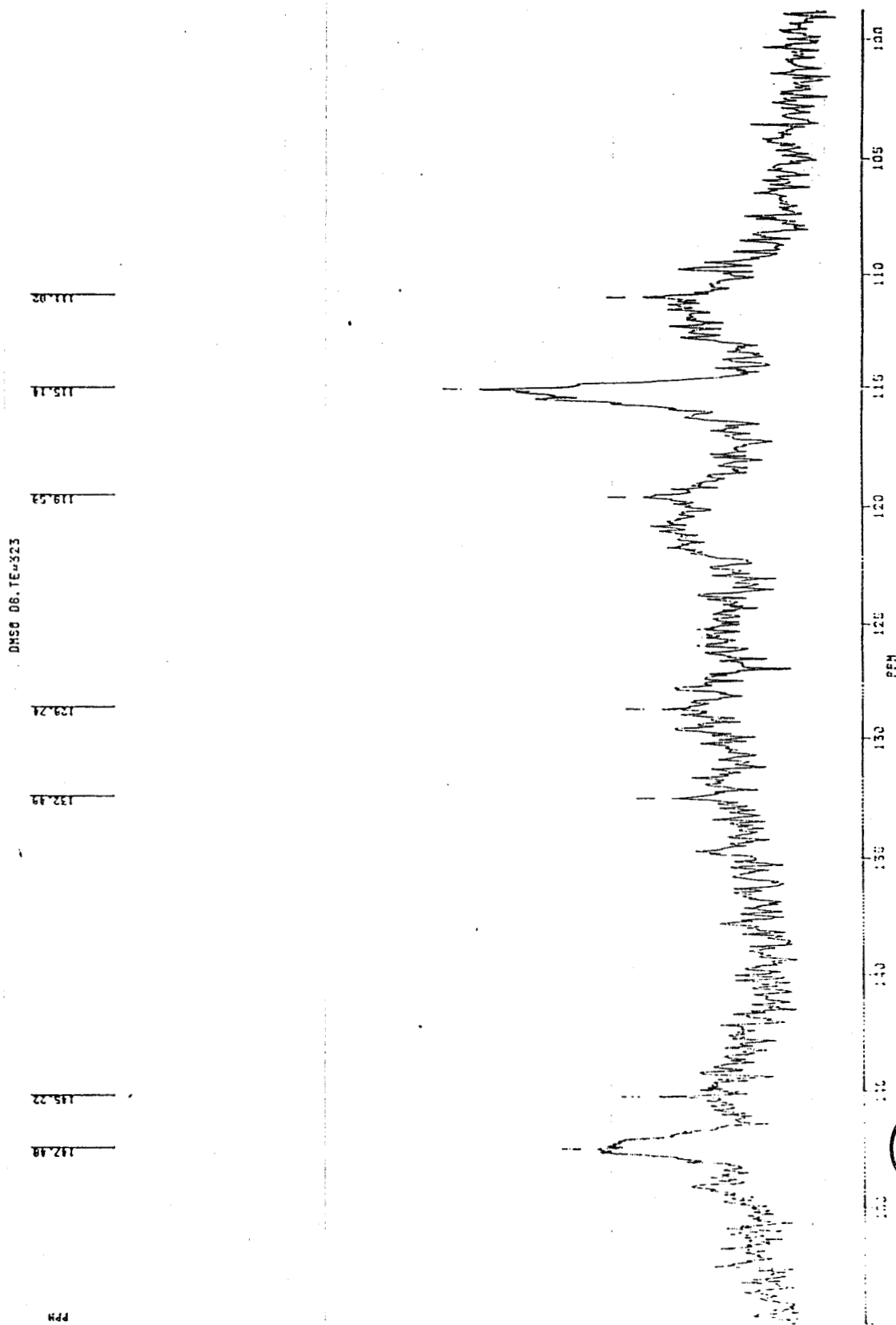
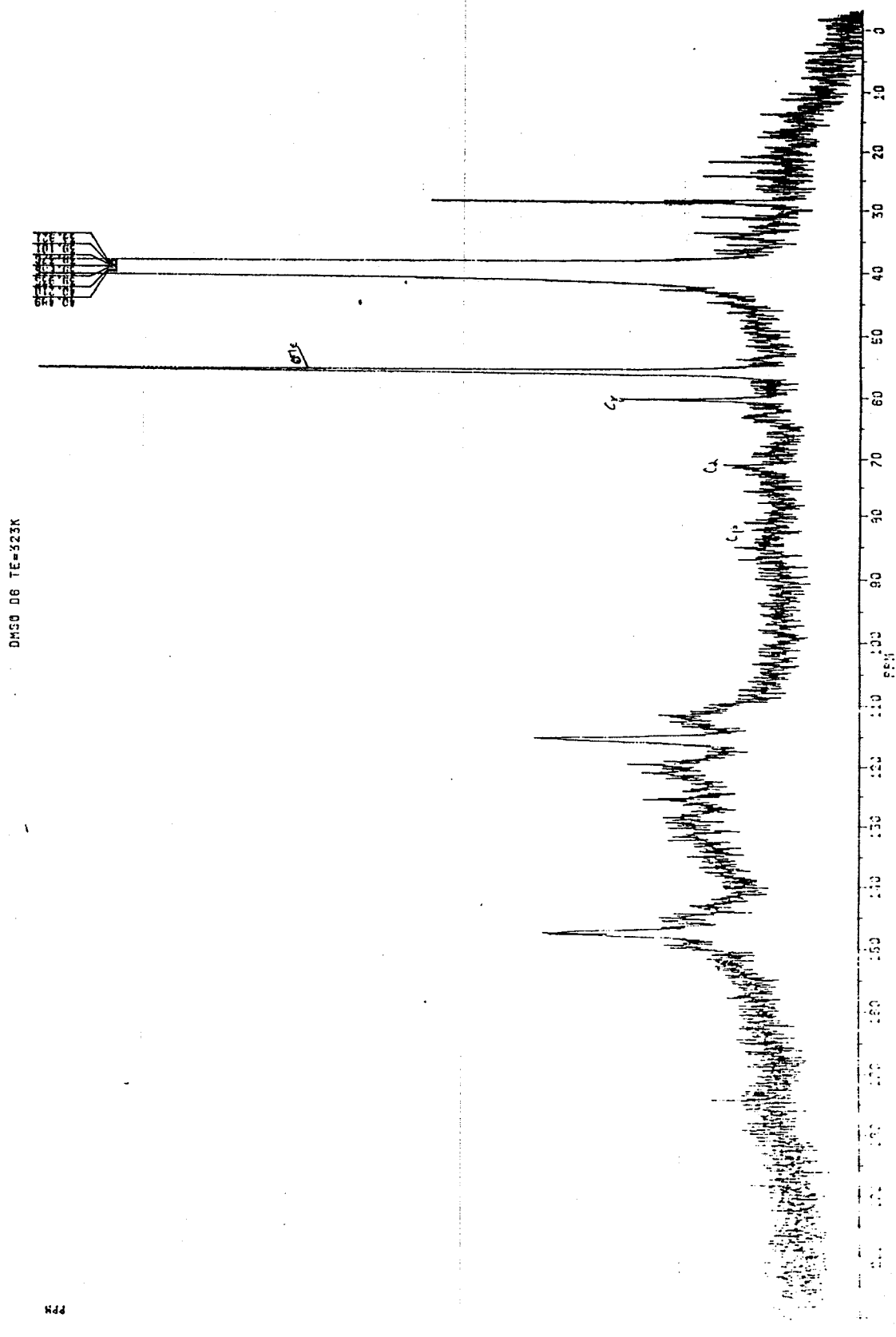


Fig. 58 : Agrandissement de la région des aromatiques du spectre RMN de l'Induline d'origine



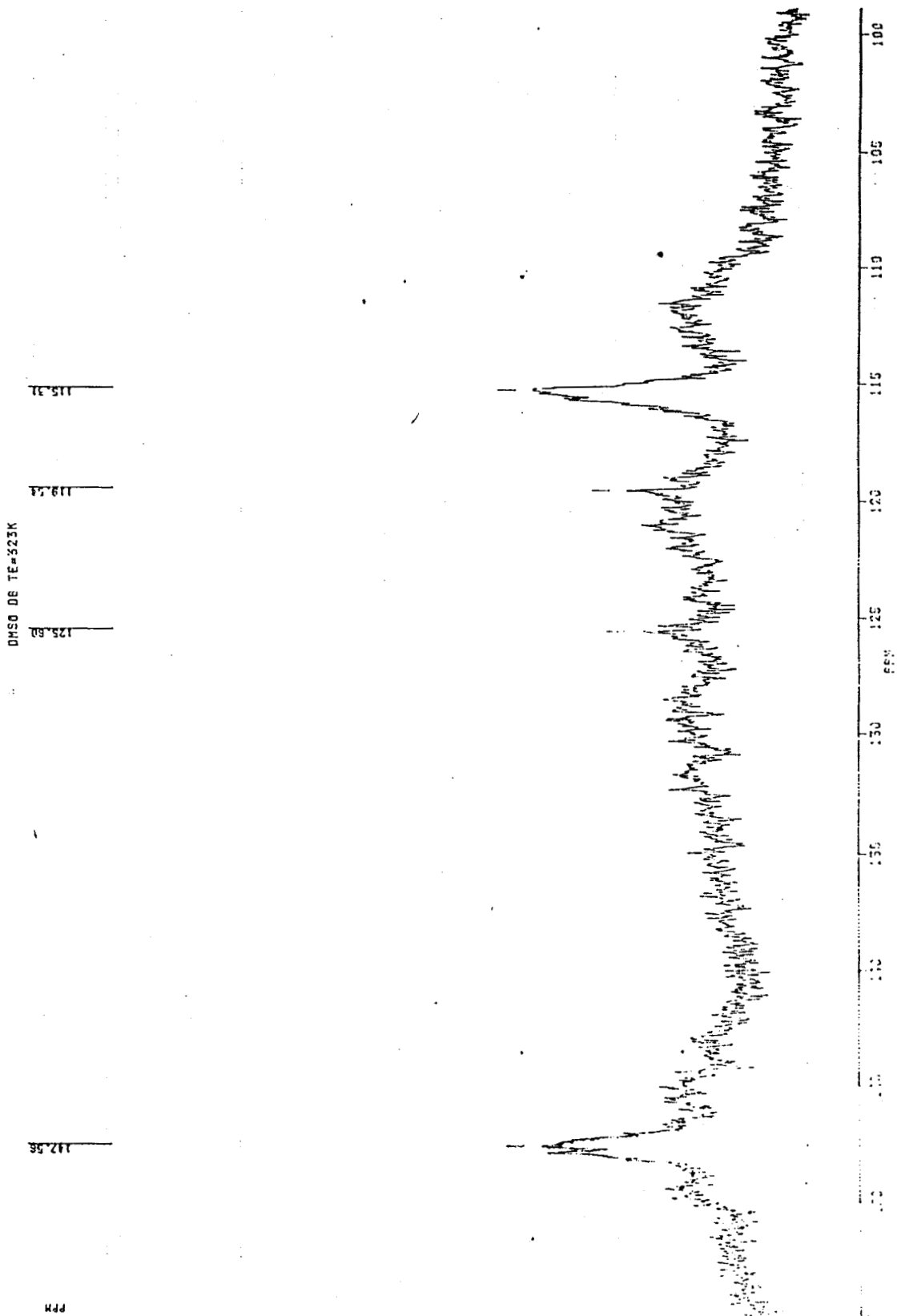


Fig. 60 : Agrandissement de la région des aromatiques du spectre RMN de l'Induline après action microbienne

Conclusions

Hormis le fait que les analyses en RMN mériteraient d'être plus poussées, certaines observations importantes semblent pouvoir se dégager des spectres ainsi obtenus. Par exemple, la réduction du signal à 148 ppm pourrait impliquer la dégradation des noyaux syringyles ou bien des unités guaiacyles libres. Toutefois, ces variations seraient accompagnées de l'augmentation de la taille d'autres massifs résultant des réactions de recondensation. Cette hypothèse pourrait expliquer le déplacement des maxima d'absorption dans l'U.V.

Cependant, en aucun cas, les modifications observées sur les spectres RMN ne sont suffisamment évidentes pour être concluantes, mais doivent néanmoins être considérées comme des indices positifs de la modification des structures de la lignine. Une analyse plus minutieuse serait souhaitable afin de pouvoir établir avec certitude la fréquence et l'importance des modifications résultant de l'activité bactérienne.

CONCLUSION

DISCUSSION GENERALE

L'adaptation des micro-organismes provenant d'un digesteur dans un milieu contenant de la lignine modifiée comme seule source de carbone a été atteinte après une série d'enrichissements contrôlés.

La modification des paramètres d'incubation tout au long des différentes étapes de l'étude ne permet pas de comparer directement les cinétiques enregistrées pour chacune d'entre elles. Cependant, des aspects tels que la durée de l'adaptation aux nouvelles conditions et le degré de modification ou de dégradation des lignines méritent d'être analysés de façon à pouvoir établir des critères les plus adéquats à la croissance des organismes anaérobies ayant une activité ligninolytique.

Au début, l'utilisation d'un milieu complexe (BCYT) et de différentes conditions de température et de pH a permis de sélectionner les paramètres d'incubation de façon à avoir une bonne croissance bactérienne, une solubilisation raisonnable de la lignine dans le milieu ainsi qu'une modification importante des paramètres mesurant la dégradation de la lignine.

Cependant, ainsi qu'on l'a signalé par ailleurs, la présence des matières organiques autres que les lignines modifiées impliquait, lors des premiers essais des interférences dans les mesures de paramètres employés pour le suivi des incubations. D'autre part, une adaptation au substrat a été mise en évidence; cependant, après plusieurs enrichissements dans le milieu BCYT, nous avons décidé de modifier le milieu de culture en enlevant de sa composition l'extrait de levure et la tryptone, et en ne laissant comme additifs organiques importants que la cystéine, ajoutée comme agent réducteur, et la lignine, sujet de l'étude.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché essentiellement à obtenir un développement de la population microbienne dans les conditions

sélectionnées à partir du premier essai. Malgré une apparente inhibition de la dégradation de la lignine, ainsi que de la méthanogenèse, nous avons mis en évidence une variation considérable de l'absorbance U.V., surtout pour les flacons contenant la lignine KRAFT de paille et dont le pH était de 7,8.

La solubilité des lignines modifiées dans le milieu de culture semble avoir une grande importance pour son accessibilité à l'attaque microbienne. C'est pour cette raison essentiellement que la lignine KRAFT de paille, qui était la plus soluble parmi les préparations de laboratoire fut utilisée comme substrat jusqu'à la fin du travail, tandis que les autres furent éliminées des étapes subséquentes.

De toute évidence, une concentration élevée de la lignine dans le milieu de culture provoque une inhibition de la méthanogenèse et une prolongation de la période d'adaptation .

Malgré les différences introduites d'une étape à la suivante, nous avons constaté que la majorité de la dégradation (d'après les données d'absorbance U.V.) s'effectue pendant la phase initiale des incubations, une dégradation beaucoup plus lente ayant lieu par la suite. Ceci dérive peut-être du fait que les microorganismes attaquent et catabolisent d'abord les fractions oligomères plus accessibles de la lignine, et lentement les parties plus polymérisées qui semblent former une structure assez tenace.

L'obtention d'une lignine dépourvue de sucres pour la réalisation des études de dégradation s'avère une tâche compliquée et pas très efficace car l'étroite liaison entre les oses (surtout des hémicelluloses) et la lignine semble presque aussi difficile à rompre que les liaisons inter-monomères de la lignine elle-même. Par ailleurs, si l'on dispose des outils analytiques appropriés (tels que la RMN ou les systèmes de marquage de molécules), il est possible de suivre séparément les cinétiques du catabolisme de chaque type de composé. Enfin, les résidus des oses liés à la lignine pourraient remplir une certaine fonction pendant les fermentations, ainsi qu'on a pu l'observer dans les différentes étapes de notre travail ; les sucres libérés graduellement

dans le milieu seraient catabolisés par des voies métaboliques normales et pourraient fournir l'énergie nécessaire à la coupure des liaisons de la lignine, laquelle une fois dépolymérisée pourrait à son tour être incorporée dans les schémas métaboliques des cellules. Toutefois, l'emploi des lignines purifiées doit être envisagé, une fois la certitude acquise de l'existence d'une activité lignolytique chez une souche bactérienne ou, comme dans notre cas, chez une culture mixte adaptée à l'utilisation de ce type de substrat.

La comparaison entre les dernières étapes dans lesquelles les environnements de culture sont semblables permet de tirer certaines conclusions. La solubilité plus réduite des lignines ajoutées au milieu durant l'étape V joue un rôle primordial sur la production de méthane. D'ailleurs la fraction solubilisée de lignine, mineure comparativement à d'autres essais (ainsi que l'indiquent les valeurs d'absorbance dans l'U.V.) était sensiblement dégradée aussi bien pour la lignine KRAFT de paille que pour la lignine de référence (Induline Westvaco AT).

Une adaptation semble avoir lieu lors du passage d'une étape à la suivante.

Il existe une relation apparente entre la cinétique d'évolution des sucres et celle des lignines. Ainsi, lorsqu'il y a un catabolisme accentué des sucres, la dégradation de la lignine semble être ralentie à juger par les données obtenues pour les diverses phases de cette étude. Par ailleurs, nous avons observé une production plus importante de méthane dans les essais où la concentration des sucres diminuait plus sensiblement.

L'adaptation graduelle, ainsi que les interactions entre les divers groupes qui forment la culture mixte, ont été mis en évidence dans les derniers essais, ainsi que le montrent les résultats obtenus.

La plus grande disponibilité des sources d'énergie (telles que les sucres) dans le milieu, pour certains groupes de bactéries (telles que les acétogènes et les méthanogènes) permettrait leur développement plus rapide et

leur prédominance dans la culture avec, pour conséquence, une réduction de l'activité des autres bactéries présentes, dont les ligninolytiques. Ces modifications de flore expliqueraient les observations réalisées durant le suivi des dernières étapes.

Il conviendrait de définir le rôle des oses dans les mécanismes de dégradation anaérobie des lignines modifiées. A cet effet, l'emploi de lignines marquées doit être envisagé. Le marquage moléculaire sélectif, tel qu'il a été décrit par BENNER et HODSON (1985b) pourrait éclaircir la participation des divers groupes bactériens dans le métabolisme de ce type de matériaux organiques. Par ailleurs, en ce qui concerne les modifications de la lignine, au niveau de la structure moléculaire, la RMN est un outil analytique capable d'apporter des précisions importantes pour la définition des voies métaboliques impliquées dans la biodégradation anaérobie des lignines modifiées.

Finalement, des expériences avec des composés modèles pourraient aussi contribuer à l'interprétation des spectres obtenus par RMN, et à l'élucidation des réactions qui ont lieu pendant cette fermentation.

Perspectives pour la continuation de l'étude :

- L'isolement et caractérisation des espèces bactériennes qui forment la culture mixte doivent être envisagés comme une séquence logique de suivi de ce travail.

- La définition du rôle de chacune des espèces microbiennes dans le métabolisme des matériaux lignocellulosiques pourrait alors être délimitée.

- L'optimisation des conditions de culture pour assurer une meilleure activité ligninolytique pourrait aussi être entreprise, de même que l'isolement des enzymes (exoenzymes) qui réalisent les ruptures des liaisons chimiques à l'intérieur des polymères de lignine.

- La détermination du rôle des résidus d'oses attachés à la lignine

dans sa biodégradation doit être précisée par une analyse plus ponctuelle (acétates d'alditols) des sucres présents, ainsi que des monomères phénoliques.

- L'affinage des techniques analytiques pour le dosage de la lignine permettrait une quantification précise de la dépolymérisation et dégradation des lignines.

- Finalement la connaissance des différentes phases ayant lieu durant l'incubation donnerait la possibilité de manipuler les conditions de culture et le substrat de façon à obtenir les produits désirés, (soit par dégradation totale jusqu'à CO_2 et CH_4 , soit jusqu'à composés monomériques) dans une période de temps plus raisonnable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADLER E. (1977). Wood Sci. Technol. 11:169-218.
- AKIN D.E. (1976). J. Bacteriol. 125, 3:1156-1162.
- AKIN D.E. (1980). Appl. Env. Microbiol., 40, 4:809-820.
- AKIN D.E. (1982). In : J.B. HACKER (ed.) Nutritional limits to animal production from pastures. p. 201-223. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, United Kingdom.
- AKIN D.E. (1983). Appl. Environ. Microbiol. 147:738.
- ALIC M., LETZRING C. et GOLD M.H. (1987). International Seminar on Lignin Enzymic and Microbial Degradation. April 23-24, PARIS, France.
- AVGERINOS G.C. et WANG D.I.C. (1983). Biotechnol. Bioeng., 26:67-83.
- BACCAY R.A. et HASHIMOTO A.G. (1984). Biotechnol. Bioeng., 26:885-891.
- BACHE R. et PFENNIG N. (1981). Arch. Microbiol. 130:255-261.
- BAK F. et WIDDEL F. (1986). Arch. Microbiol. 146:177-180.
- BAKKER G. (1977). FEMS Microbiol. Lett. 1:103-108.
- BALBA M.T. et EVANS W.C. (1977) Biochem. Soc. Trans. 5:302-304.
- BALBA M.T., CLARKE N.A. et EVANS W.C. (1980). Biochem. Soc. Trans. 5:302-304.
- BARTON F.E. et AKIN D.E. (1977) Agric. Food Chem. 25:1299-1303.
- BAUCHOP T. (1979). Ann. Rech. Vet. 10:246-248.
- BAUCHOP T. (1981). Agr. Environ. 6:339.
- BECKMANN E., LIESCHE O. et LEHMANN F. (1923). Biochem. Z. 139:491.
- BENNER R., MACCUBIN A.E. et HODSON R.E. (1984). Appl. Env. Microbiol., 47, 5:998-1004.
- BENNER R. et HODSON R.E. (1985a). Mar. Ecol. Prog. Ser., 23:221-230.
- BENNER R. et HODSON R.E. (1985b). Appl. Env. Microbiol. 50, 4:971-976.
- BJÖRKMAN A. (1952). The chemistry of lignin. Acad. Press, New York, p. 51, 53, 64.
- BJÖRKMAN A. (1957). Svensk Papperstidn p. 60, 158, 243, 285, 392.

- BOSSERT I.D., RIVERA M.D. et YOUNG L.Y. (1986). FEMS Microbiol. Ecology 38:313-319.
- BOSSERT I.D. et YOUNG L.Y. (1986). Appl. Env. Microbiol. 52, 5: 1117-1122.
- BOURBONNAIS R. et PAICE M.G. (1987). International Seminar on Lignin Enzymic and Microbial Degradation. April 23, 24, PARIS, France.
- BOYD S., SHELTON D.R., BERRY D. et TIEDJE J.M. (1983). Appl. Env. Microbiol. 46, 1:50-54.
- BRAUNS F.E. (1939). J. Am. Chem. Soc. 61:2120.
- BROWNELL H.H., YU K.C. et SADDLER J.N. (1986). Biotechnol. Bioeng. 28:792-801.
- BUSWELL J.A., ANDER P. et ERIKSON K.E. (1982). Arch. Microbiol. 133:161-165.
- BUSWELL J.A., MOLLET B. et ODIER E. (1984) FEMS Microbiol. Lett. 25:295-299.
- CARIOCA J.O.B., PANNIRSELVAM F., HORTA E.A. et ARORA H.L. (1985). Biotechnol. Lett. 3:213-216.
- CHANDLER J.A. (1980). MSc. Thesis Cornell University.
- CHANDLER J.A., JEWELL W.J., GOSSETT J.M., VAN SOEST P.J. et ROBERTSON J.B. (1980). Biotechnol. Bioeng. Symp. 10:93-108.
- CHEN W., SUPANWONG K., OHMIYA K., SHIMIZU S. et KAWAKAMI H. (1985). Appl. Env. Microbiol. 50, 6:1451-1456.
- CHYNOWETH D.P., JERGER D.E. (1985). Dev. Ind. Microbiol. 26:235-246.
- CLAYTON N.E. et SRINIVASAN V.R. (1981). Naturwissenschaften 68:97-98.
- COLBERG P.J. et YOUNG L.Y. (1982). Can. J. Microbiol., 28:886-889.
- COLBERG P.J. et YOUNG L.Y. (1985a). Appl. Env. Microbiol. 49, 2: 345-349.
- COLBERG P.J. et YOUNG L.Y. (1985b). Appl. Env. Microbiol. 49, 2: 350-358.
- COLONNA-CECCALDI B., BOUVET P., DESCHAMPS A.M. et GUESPIN-MICHEL J. (1987). International Seminar on Lignin Enzymic et Microbial Degradation. April 23-24, PARIS, France.
- COOPER G.D., GILBERT A.R. et FINKBEINER H. (1966). Polym. Prep. 7: 166.

- CORNISH FRAZER A. et YOUNG L.Y. (1986). *Appl. Env. Microbiol.*, 51, 1:84-87.
- CRAWFORD D.L., CRAWFORD R.L., POMETTO III A.L. (1977). *Appl. Env. Microbiol.* 33:1247-1251.
- CRAWFORD D.L. (1978). *Appl. Env. Microbiol.* 35:1041-1045.
- CRAWFORD R.L., CRAWFORD D.L. (1978). *Dev. Ind. Microbiol.* 19:35-49.
- CRAWFORD D.L., CRAWFORD R.L. (1980). *Enz. Microb. Technol.* 2:11-22.
- CRAWFORD D.L., SUTHERLAND J.B., POMETTO III A.L., CRAWFORD R.L. (1979). Symposium on Biosynthesis and Biodegradation of Cell Walls Components. ACS/CSJ Chemical Congress, HONOLULULU, Hawaii, April 1-6.
- CRAWFORD D.L., BARDER M.J., POMETTO III A.L., CRAWFORD R.L. (1982). *Arch. Microbiol.* 131:140-145.
- CRAWFORD D.L., POMETTO III A.L. et CRAWFORD R.L. (1983). *Appl. Env. Microbiol.* 45:898.
- CUNNINGHAM R.L. et CARR M.E. (1984). *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 14: 95-103.
- CUNNINGHAM R.L., CARR M.E. et BAGBY M.O. (1985). *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 15:17-26.
- DALE B.E., MOREIRA M.J. (1982). *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 12:31-43.
- DATTA R. (1981). *Biotechnol. Bioeng.* 23:61-67.
- DEMEYER D.I. (1981). *Agric. Env.* 6:295-337.
- DESCHAMPS A.M., MAHOUDEAU G., LEBEAULT J.M. (1980). *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 9:45.
- DESCHAMPS A.M., LEBEAULT J.M. (1980). *C.R. Acad. Sciences, Sér. D* 291:485-487.
- DOLFING J. et TIEDJE J.M. (1986). *FEMS Microbiol. Ecology* 38:293-298.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F. (1956). *Anal. Chem.* 28:350-356.
- DUMON R. et GELUS M. (1982). *La valorisation chimique du bois.* PARIS, Masson (eds).
- DUTTON P.L. et EVANS W.C. (1968). *Biochem. J.* Vol. 109, 5 p.
- EVANS W.C. (1977). *Nature* 270:17-22.

- FAHEY G.C. Jr., Mc LAREN G.A. et WILLIAMS J.E. (1979). J. Anim. Sci. 48:941.
- FAN L.T., GHARPURAY M.M. et LEE Y.H. (1981). Biotechnol. Bioeng. 26:885-891.
- FEDERLE T.W. et VESTAL J.R. (1980). Appl. Env. Microbiol. 40:32-39.
- FERRY J.G. et WOLFE R.S. (1976). Arch. Microbiol. 107:33-40.
- FINA L.R., BRIDGES R.L., COBLENTZ T.H. et ROBERTS F.F. (1978). Arch. Microbiol. 118:169-172.
- FLORY P.J. (1975). *In: Principles of Polymer Chemistry, 9th Ed.*, Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y.
- FORNEY L.J., REDDY C.A., TIEN M. et AUST S.D. (1982). J. Biol. Chem. 257:11455-11462.
- FRAZER A.C. et YOUNG L.Y. (1985). Appl. Env. Microbiol. 49:1345-1347.
- FRAZER A.C. et YOUNG L.Y. (1986).
- FREUDENBERG K. (1968). *In: The Constitution et Biosynthesis of Lignin.* Freudenberg K. et NEISH A.C. (eds). Springer Verlag, BERLIN.
- GIBBS R.D. (1958). *In: The Physiology of Forest Trees* (E. THIMANN, ed) pp. 269-312.
- GOERING H.K. et VAN SOEST P.J. (1970). Agriculture Handbook, 379, Agricultural Research Service, USDA, WASHINGTON D.C.
- GORING D.A.I. et REZANOWICH (1959). Can. J. Chem. 36:1653.
- GOSSET J.M. et Mc CARTY (1975). AIChE Symp. Series 72, 158:65-71
- GRADZIEL K., HAIDER K., KOCHNANDSHA J., MALARCZYK E., TROJANOWSKI J. (1978). Acta Microbiologica Pol. 27:103-109.
- GRBIC-GALIC D. et YOUNG L.Y. (1985). Appl. Env. Microbiol. 50, 2: 292-297.
- GRBIC-GALIC D. (1986). FEMS Microbiol. Ecology 38:161-169.
- GRISEBACH H. (1981). *In: The Biochemistry of Plants.* Stumpf P.K., Conn E.E. eds, Vol. 7, p. 457. Academic Press, New York.
- HACKETT W.F., CONNORS W.J., KIRK T.K. et ZEIKUS J.G. (1977). Appl. Env. Microbiol. 38:84-89.
- HAIDER K., TROJANOWSKI J., SUNDMAN (1978). Arch. Microbiol. 119: 103-106.

- HALUK J.P., TRAOPE O. et METCHE M. (1978). Bull. de liaison N° 8 du Groupe Polyphénols. Compte-rendu des Journées Internationales d'Etude et de l'Assemblée Générale, NANCY 17-19 Mai.
- HAMMEL K.E., KALYANARAM B. et KIRK T.K. (1987). International Seminar on Lignin Enzymic and Microbial Degradation. April 23-24, PARIS, France.
- HASHIMOTO A.G. (1982). Agric. Wastes 4:345-364.
- HASHIMOTO A.G. (1986). Biotechnol. Bioeng. 28:1857-1866.
- HATAKKA A., KANTELINEN A., TERVILÄ-WILO A. et VIKARI L. (1987). International Seminar on Lignin Enzymic and Microbial Degradation. April 23-24, PARIS, France.
- HATFIELD G.R., MACIEL G.E., ERBATUR O. et ERBATUR G. (1987). Anal. Chem. (c), 1:172-179.
- HAYAISHI O. (1964). Plenary sessions. Sixth Int. Cong. Biochem., New York I.V.B., Vol. 33, p. 31.
- HEALY J.B. et YOUNG L.Y. (1978). Appl. Env. Microbiol. 35, 1:216-218.
- HEALY J.B. et YOUNG L.Y. (1979). Appl. Env. Microbiol. 38, 1:84-89.
- HEALY J.B., YOUNG L.Y. et REINHARD M. (1980). Appl. Env. Microbiol. 39, 2:436-444.
- HEMMINGSON J.A. (1983). J. Wood Chem. Technol. 3, 3:289-312.
- HERGERT (1960). J. Org. Chem. 25:405
- HIGHLEY T.L. (1982). Can. J. For. Res. 12:435.
- HOLT D.M. et JONES E.B.G. (1983). Appl. Env. Microbiol. 46, 3:722-727.
- HUTBER D.W. et RIBBONS D.W. (1983). J. Gen. Microbiol. 129:2413-2420.
- JANSHEKAR H., BROWN C., FIECHTER A. (1981). Anal. Chim. Acta 130: 81.
- JANSHEKAR H., BROWN C., FIECHTER A. (1981). Anal. Chim. Acta 130: 81.
- JANSHEKAR H. et FIECHTER A. (1983). In : Advances in Biochem. Eng. Biotechnol. A. Fiechter, Ed. Vol. 27, p. 120. Springer Verlag, BERLIN.
- JETER R.M. et INGRAHAM J.L. (1981). In : The Prokaryotes. Starr M. P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A. and Schlegel H.G. p. 913-925. Springer Verlag, New York.

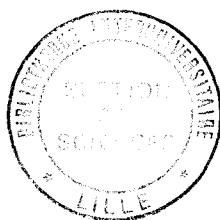
- JOKELA J., PELLINEN J., SALKINOJA-SALONEN M. et BRUNOW G. (1985). Appl. Microbiol. Biotechnol. 23:38-46.
- JOKELA J., PELLINEN J. et SALKINOJA-SALONEN M. (1987). International Seminar on Lignin Enzymic and Microbial Degradation. April 23-24, PARIS, France.
- KATAYAMA Y., NISHIKAWA S., MOROHOSHI N., HARAGUCHI T., KUWANA Y. et YAMASKI M. (1987). International Seminar on Lignin Enzymic and Microbial Degradation. April 23-24, PARIS, France.
- KAWAKAMI H. (1975). Mokuzai Gakkaischi 21:629-634.
- KAISER J.P. et HANSELMANN K.W. (1982a). Arch. Microbiol. 133:185-194.
- KAISER J.P. et HANSELMANN K.W. (1982b). Experientia 38:167-176.
- KEITH C.L. (1972). Dissertations Abstr. Intern. B. 33 p. 3214-3215.
- KEITH C.L., BRIDGES R.L., FINA L.R., IVERSON K.L. et CLOVAN J.A. (1978). Arch. Microbiol. 118:173-176.
- KENNER J. (1960). Tetrahedron 8:350.
- KIRK T.K. (1971). Ann. Rev. Phytopath. 9:185-210.
- KIRK T.K., HIGHLEY T.L. (1973). Phytopath. 63:1338-1342.
- KIRK T.K. (1975). Holzforschung 29:99-107.
- KIRK T.K., SCHULTZ E., CONNORS W.J., LORENZ L.F. et ZEIKUS J.G. (1978). Arch. Microbiol. 118:277-285.
- KIRK T.K. (1981). In : Trends in Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals (Hollaender A., ed) New York Plenum.
- KIRK T.K. et FENN P. (1982). In : Decomposer Basidiomycetes. Frankland J.C., Hedger J.N. and Swift M.J. (eds.) 4th Symp. Br. Mycol. Soc. p. 67-90. Cambridge Univ. Press, LONDON.
- KIRK T.K. (1986). In : 30^{ème} Réunion de la Société Française de Phytopathologie, PARIS, 14-17 Avril.
- KIRK T.K. (1987). International Seminar on Lignin Enzymic and Microbial Degradation. April 23-24, PARIS, France.
- KLASON P. (1893). Tek. Tidskr. Afdeling Kemi. Metallurgi 23, 49: 63.
- KREIKENBOHM R., PFENNIG N. (1985). FEMS Microbiol. Lett. 31:29-38.
- KREMERS R.E. (1957). Tappi 40:262.
- KVC J., HAMMERSCHMIDT R. (1982). Physiol. Plant. Pathol. 20:61.

- LEATHAM G.F. et KIRK T.K. (1983). FEMS Microbiol. Lett. 16:65-67.
- LOEWUS F.A. (1952). Anal. Chem. 24:219.
- LUNDQUIST K. et SIMONSON R. (1975). Svensk Papperstidning, 11:390.
- LUNDQUIST K., OHLSSON B. et SIMONSON R. (1977). Svensk Papperstidning, 5:143-144.
- LUNDQUIST K. et KIRK T.K. (1980). Tappi, 63, 1:80-82.
- Mc CARTHY A.J., BRODA P. (1984). J. Gen. Microbiol. p. 2905-2913.
- Mc CARTY P.L., YOUNG L.Y., GOSSETT J.M., STUCKEY D.C. et HEALY Jr. J.B. (1976). In : Microbial Energy Conversion (SCHLEGEL et BARNEA, eds.) p. 179-200.
- Mc DONALD D.G., BAKHSHI N.N., MATHEWS J.F., ROYCHOWDHURG A., BAJPAI P. et MOO-YOUNG M. (1983). Biotechnol. Bioeng. 25:2067-2076.
- MERTENS D.R. (1977). Fed. Proc. 36:187-192.
- McINERNEY M.J., BRYANT M.P., HESPELL R.B. et COSTERTON J.W. (1981). Appl. Env. Microbiol. 41:1029-1039.
- MILSTEIN O., GRESSEL J. et FLOWERS H.M. (1981). Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 13:117-127.
- MIRON J. et BEN-GHEDALIA (1981). Biotechnol. Bioeng. 23:2863-2873.
- MOLINA D.E., PEROTTI DE GALVEZ N.I., FRIGERIO C.I. et CORDOBA P.R. (1984). Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:335-339.
- MONTIES B. (1981). Holzforschung B5 p. 217.
- MONTIES B. (1982). In : Les Polymères Végétaux. B. MONTIES (ed.) Gauthier-Villars, PARIS.
- MORRISON I.M. (1979). Proc. Nutr. Soc. 38:269-274.
- MOUNTFORT D.O. et BRYANT M.P. (1982). Arch. Microbiol. 133:249-256.
- MOUNTFORT D.O., BRULLA W.J., KRUMHOLTZ L.R., BRYANT M.R. (1984). Int. J. Syst. Bacteriol. 34:216-217.
- MOUNTFORT D.O. et ASHER R.A. (1986). Arch. Microbiol. 144:55-61.
- MULLER P.C. et GLASSER W.G. (1983). Biotechnol. Bioeng. Symp. 13: 481-494.
- MUNTIFERING R.B. (1982). J. Animal Sci., 55, 2:432-438.
- NEILSON A. (1981). IVL Swedish Water and Pollution Res. Inst., Report B-660 STOCKHOLM.

- NEUFELD R.D., MACK J.D. et STRAKEY J.P. (1980). J. Wat. Pol. Cont. Fed., Vol.52, 9.
- NIKITIN N.I. (1962). The Chemistry of Cellulose and Wood. S. MONSON (ed.) Israel Program for Scientific Translations. JERUSALEM, Israël.
- NIMZ H. (1974). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 5:843.
- ODIER E., JANIN G., MONTIES B. (1981). Appl. Env. Microbiol. 41: 337.
- ODIER E. et MONTIES B. (1977). C.R. Acad. Sc. Paris 284:2175-2178
- ODIER E. et MONTIES B. (1983). Appl. Env. Microbiol. 46, 3:661-665.
- ODIER E. (1986). Thèse Docteur d'Etat es-Sciences, Univ. PARIS VII.
- OHMIYA K., TAKEUCHI M., CHEM W., SHIMIZU S. et KAWAKAMI H. (1986). Appl. Microbiol. Biotechnol. 23:274-279.
- ORPIN C.G. et LETCHER A.J. (1979). Cur. Cont. 3:121-124.
- OSHIMA T. (1965). Allg. Mikrobiol. 5:386-394.
- PAVLOSTATIS S.G. et GOSSETT J.M. (1985). Biotechnol. Bioeng. 27: 334-344.
- PHELAN M.B., CRAWFORD D.L., POMETTO A.L. (1979). J. Can. Microbiol. 25:1270-1276.
- PIGDEN W.J. et HEANEY D.P. (1969). Adv. Chem. Ser. 95:245-261.
- PLAYNE M.J. (1984). Biotechnol. Bioeng. 26:426-433.
- RAABE E.W. (1968). J. Wat. Pol. Cont. Fed. 40:R145-R150.
- REEVES III J.B. (1985). J. Animal Sci. 60:316-322.
- REID I.D. (1979). Can. J. Bot. 57:2050-2058.
- RITCHIE P.F. et PURVES C.B. (1947). Pulp and Paper Mag. Canada 48: 74.
- ROBINSON L.E., CRAWFORD R.L. (1978). FEMS Microbiol. Lett. 4:301-302.
- RUBIO TORRES M., HEITZ M., CHAUVETTE G. et CHORNET E. (1986). Biomass 10:85-96.
- SARKANEN K.V. (1971). In : Lignins. Occurrence, Formation, Structure and Reactions. SARKANEN K.V. et LUDWIG C.H. (eds.). Wiley Interscience, New York.

- SCHAEFFER J., SEFCIK M.D., STEJSKAL E.O. et MCKAY R.A. (1981). *Macromolécules* 14:557-559.
- SCHINK B. et PFENNIG N. (1982). *Arch Microbiol.* 133:195.
- SCHLOMI E.R., LANKHORST A. et PRINS R.A. (1978). *Microbial Ecology* 4:249-261.
- SJÖSTROM K., DOLATA M. et NYMAN P.O. (1987). *International Seminar on Lignin Enzymic and Microbial Degradation. April 23-24, PARIS, France.*
- SLEAT R. (1981). Ph.D. Thesis, Univ. of LONDON.
- SLEAT R. et ROBINSON J. (1983). *J. Gen. Microbiol.* 129:141-152.
- SLEAT R. et ROBINSON J.P. (1984). *J. Appl. Bacteriol.* 54:381-394.
- SPENCER R.R. et AKIN D.E. (1980). *J. Anim. Sci.* 51:1189.
- SZEWZYK V., SZEWZYK R. et SCHINK B. (1985). *FEMS Microbiol. Ecology* 31:79-87.
- TANAKA M., CAMPBELL R., MOO-YOUNG M. (1985). *Biotechnol. Bioeng.* 27:362-368.
- TARVIN D. et BUSWELL A.M. (1934). *J. Am. Chem. Soc.* 56:1751-1755.
- TAYLOR B.F. (1983). *Appl. Env. Microbiol.* 46, 6:1286-1292.
- TAYLOR B.F., CAMPBELL W.L. et CHINOY I. (1970). *J. Bacteriol.* 102: 430-437.
- TAYLOR B.F. et HEEB M.J. (1972). *Arch Microbiol.* 83:165-171.
- TOLLNER E.W. et HILL D.T. (1981). *Am. Soc. Agric. Eng., Winter Meeting, Dec.15-18, CHICAGO, Ill.*
- TOUZEL J.P., ALBAGNAC G. (1983). *FEMS Microbiol. Lett.* 16:241-265.
- TROJANOWSKI J., HAIDER K., SUNDMAN V. (1977). *Arch. Microbiol.* 114:149-153.
- VAN SOEST P.J. (1981). *Agric. and Environ.* 6:135-143.
- WALDO D.R., SMITH L.W. et COX E.L. (1972). *J. Dairy Sci.* 55:125.
- WILLERSHAUSEN H., JAEGER A. et GRAF H. (1987). *International Seminar on Lignin Enzymic and Microbial Degradation. April 23-24, PARIS, France.*
- WILLIAMS R.J. et EVANS W.C. (1975). *Biochem. Journal*, 148:1-10.
- WINDHAM W.R. et AKIN D.E. (1984). *Appl. Env. Microbiol.* 48, 3:473-476.
- YOUNG L.Y. et RIVERA M.D. (1985). *Water Res.* 19, 10:1325-1332.

- ZEIKUS J.G. (1977). Bacteriol. Rev. 41:514.
- ZEIKUS J.G. (1980). In : T.K. KIRK, T. HIGUCHI et H.M. CHANG (eds.) Lignin biodegradation : microbiology chemistry and potential applications. CRC Press, New York, p. 101-109.
- ZEIKUS J.G. (1981). In : Advances in Microbial Ecology Vol. 5 Plenum Publishing Corp.





RESUME

Nous avons essayé de démontrer la dégradabilité microbienne de lignines de type industriel (lignine KRAFT et lignine à la soude de paille de blé et de sciure de peuplier, Induline AT Westvaco) en anaérobiose par une culture mixte provenant d'un digesteur anaérobie traitant des contenus de panse de ruminants.

Un temps d'incubation prolongé s'est avéré nécessaire pour la mise en évidence de modifications dans la structure des lignines par spectrophotométrie U.V., chromatographie sur gel, C.H.L.P. et R.M.N. Toutefois une adaptation des microorganismes à l'utilisation des lignines comme seule source de carbone a été démontrée par le développement des bactéries dans un milieu minéral vitaminé tamponné par l'HEPES. Les résidus oligosaccharidiques liés à la lignine semblaient favoriser la dégradation des lignines.

Des facteurs tels que la solubilité des lignines, le pH, ainsi que la procédure d'extraction et la concentration dans le milieu de culture, provoquaient des variations dans la phase d'adaptation et dans le degré d'attaque bactérienne des structures polyphénoliques. Ces observations nous ont amené à conclure que la lignine KRAFT de paille était celle qui se dégradait le plus.

Des concentrations de lignine allant jusqu'à 6 g.l^{-1} dans un milieu minéral vitaminé non tamponné étaient capables de soutenir une croissance microbienne. Ces cultures provoquaient des modifications structurales mises en évidence par spectrographie R.M. N.