

N° d'ordre : 811

50376
1991
254



50376
1991
254

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Sciences de la Vie et de la Santé

Mention : Biotechnologies

A RETOURNER

Patricia ESTRADE

**APPROCHES ENZYMATIQUES DE LA SYNTHÈSE DE MOLECULES HYDROXYLEES PAR
DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX.**

Soutenue le 9 Décembre 1991 devant la Commission d'Examen :

Président : M. VERBERT A., Professeur, Université de Lille I

Rapporteurs : M. COUTURIER D., Professeur, Université de Lille I
M. SERIS J.-L., Chef de Département, GRL Elf-
Aquitaine, Lacq.

Examineurs : M. BELINGHERI L., M. de Conférences, Université de
Lille I
M. CHAVANT L., Professeur, Université Paul
Sabatier, Toulouse
Melle DUPONT J., M. de Conférences, M.N.H.N., Paris
M. SANCHOLLE M., Professeur, Université de Lille I

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....1

PREMIERE PARTIE : CHOIX DU SUBSTRAT, DE L'ESPECE FONGIQUE ET
ETUDE QUANTITATIVE.....8

CHAPITRE I : CARACTERISATION DES PRODUITS DE REACTIONS

ET ETUDE PRELIMINAIRE.....8

1 - INTRODUCTION.....9

2 - PRESENTATION DES SUBSTRATS ET DES PRODUITS DE
REACTION.....11

2-1 : La benzophénone.....11

2-2 : La 44' diméthoxybenzophénone.....13

3 - CARACTERISATION DES PRODUITS.....14

3-1 : La benzophénone.....14

3-2 : La 44' diméthoxybenzophénone.....15

4 - ETUDE PRELIMINAIRE.....17

4-1 : Influence de la lumière.....18

4-1-1 : Effet sur la transformation de la
benzophénone.....18

4-1-2 : Effet sur la transformation de la
44' diméthoxybenzophénone.....19

4-2 : Influence du milieu de culture.....19

4-2-1 : Effet sur la transformation de la
benzophénone.....20

4-2-2 : Effet sur la transformation de la
44' diméthoxybenzophénone.....21

5 - CONCLUSION.....21

CHAPITRE II : RECHERCHE DE SOUCHES HYDROXYLANTES OU

O-DEMETHYLANTES.....23

1 - INTRODUCTION.....23

2 - RECHERCHE DE SOUCHES HYDROXYLANT LA
BENZOPHENONE.....25

2-1 : Présentation des souches.....25

2-2 : Résultats et discussion.....26

3 - RECHERCHE DE SOUCHES O-DEMETHYLANT LA	
44' DIMETHOXYBENZOPHENONE.....	30
3-1 : Présentation des souches.....	30
3-2 : Résultats et discussion.....	31
4 - CHOIX DU SUBSTRAT ET DE LA SOUCHE.....	34

<u>CHAPITRE III</u> : MISE AU POINT DU DOSAGE QUANTITATIF.....	37
1 - INTRODUCTION.....	37
2 - L'ENSEMENCEMENT.....	38
3 - CONCENTRATION EN SUBSTRAT.....	39
4 - MISE AU POINT DU DOSAGE.....	41
4-1 : L'étalon interne.....	41
4-2 : Courbes étalons.....	42
4-3 : Influence du pH du milieu sur l'extraction.....	43

DEUXIEME PARTIE : FACTEURS INFLUENCANT LA REACTION DE O-DEMETHYLATION DE LA 44' DIMETHOXYBENZOPHENONE PAR ASPERGILLUS NIGER.....	46
---	-----------

<u>CHAPITRE IV</u> : PARAMETRES GENERAUX DE LA REACTION	47
1 - INTRODUCTION.....	47
2 - ADDITION DU SUBSTRAT A DIFFERENTS STADES DE LA CROISSANCE.....	49
2-1 : Courbes de croissance.....	50
2-2 : Bioconversion.....	51
2-3 : Conclusion.....	52
3 - ETUDES SUR LE FILTRAT DE CULTURE.....	53
3-1 : Essais de O-déméthylation.....	53
3-2 : Recherche d'activités enzymatiques particulières.....	55

<u>CHAPITRE V</u> : INFLUENCE DES FACTEURS NUTRITIFS.....	56
1 - INTRODUCTION.....	56
2 - LA SOURCE CARBONEE.....	57
2-1 : Source carbonée faiblement métabolisable...57	
2-1-1 : Le lactate.....	58

2-1-1-1 : La croissance.....	58
2-1-1-2 : La bioconversion.....	59
2-1-2 : Le glycérol.....	59
2-1-2-1 : La croissance.....	60
2-1-2-2 : La bioconversion.....	61
2-2 : Le glucose.....	62
2-2-1 : La concentration en glucose.....	62
2-2-1-1 : La croissance.....	62
2-2-1-2 : La bioconversion.....	63
2-2-2 : La cinétique de la bioconversion.....	64
3 - LES OLIGOELEMENTS.....	66
3-1 : Elimination totale des oligoéléments.....	66
3-2 : Rôle particulier de certains oligoéléments.....	68
3-2-1 : Effet du fer.....	69
3-2-1-1 : Suppression des ions ferreux...	69
3-2-1-2 : Addition d'ions ferriques.....	69
3-2-1-3 : Discussion.....	70
3-2-2 : Suppression du zinc.....	70
4 - CONCLUSION.....	72

<u>CHAPITRE VI : INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT PHYSICO-</u> <u>CHIMIQUE.....</u>	75
1 - INTRODUCTION	75
2 - FACTEURS PHYSIQUES.....	76
2-1 : L'oxygénation.....	76
2-1-1 : Transformation en conditions statiques.....	77
2-1-2 : Transformation sous atmosphère d'azote.....	78
2-2 : La lumière.....	79
2-3 : Le pH.....	80
3 - INFLUENCE DES DETERGENTS.....	83
3-1 : Effet de la nature et de la concentration en détergents.....	83
3-2 : Addition de tween 80 au moment de la bioconversion.....	86
4 - CONCLUSION.....	87

CHAPITRE VII : LES ACTEURS DE LA BIOCONVERSION ET LEURS CONCENTRATIONS.....	89
1 - INTRODUCTION.....	89
2 - LE MYCELIUM.....	90
2-1 : Influence de la densité de l'inoculum.....	90
2-2 : Variation du moment d'addition du substrat en fonction de la densité de l'inoculum....	91
3 - LE SUBSTRAT.....	93
3-1 : Influence de la nature du cosolvant.....	93
3-2 : Influence de l'addition du substrat au cours de la bioconversion.....	95
4 - LE PRODUIT FINAL.....	96
5 - CONCLUSION.....	97

TROISIEME PARTIE : PERSPECTIVES NOUVELLES.....99

CHAPITRE VIII : TRANSPOSITION A DES PROCÉDES PRE-INDUSTRIELS.....	100
1 - INTRODUCTION.....	100
2 - MISE EN OEUVRE DE MYCELIUM LIBRE.....	102
2-1 : Cultures en colonne.....	102
2-2 : Cultures en fermenteur.....	104
2-2-1 : Fermenteur de 2 litres.....	104
2-2-2 : Fermenteur de 14 litres.....	105
3 - MISE EN OEUVRE DE MYCELIUM IMMOBILISE.....	106
3-1 : Immobilisation sur trame de nylon.....	106
3-1-1 : Influence du milieu.....	107
3-1-1-1 : Diminution de la concentration.....	107
3-1-1-2 : Elimination du glucose.....	108
3-1-1-3 : Milieu pauvre.....	109
3-1-2 : Augmentation de la concentration en substrat.....	111
3-2 : Immobilisation sur anneaux de Raschig.....	114
3-2-1 : Mise en oeuvre.....	114
3-2-2 : Analyse commentée des résultats.....	115

4 - MISE EN OEUVRE EN MILIEU ORGANIQUE.....	118
4-1 : Transformation par du mycélium frais.....	118
4-2 : Transformation par du mycélium dévitalisé.....	119
4-2-1 : Essai avec de la poudre acétonique..	119
4-2-2 : Essai avec du mycélium lyophilisé...	119
5 - CONCLUSION.....	120

CHAPITRE IX : TRANSFORMATION D'AUTRES SUBSTRATS.....123

1 - INTRODUCTION.....	123
2 - NOUVEAUX SUBSTRATS ET O-DEMETHYLATION.....	124
2-1 : Benzènes méthoxylés.....	125
2-1-1 : Anisole.....	125
2-1-2 : Vératrole.....	125
2-1-3 : 1,4 diméthoxybenzène.....	126
2-2 : Acides méthoxybenzéniques.....	127
2-2-1 : Acide anisylque.....	127
2-2-2 : Acide férulique.....	127
2-3 : Substrats avec une double liaison en α ...	128
2-3-1 : Trans-anéthole.....	128
2-3-2 : 4 méthoxystilbène.....	129
2-4 : Substrats avec une fonction cétone en α ...	129
2-4-1 : 4 Méthoxyacétophénone.....	130
2-4-2 : 4' Méthoxychalcone.....	130
2-4-3 : Anisoïne.....	131
3 - DISCUSSION.....	132
4 - CONCLUSION.....	133

CONCLUSIONS GENERALES.....134

ANNEXES.....139

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....166

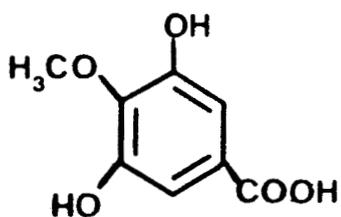
INTRODUCTION

Les applications industrielles des bioconversions semblent avoir pris un essor considérable au cours de ces dernières années. Dans le domaine plus restreint des hydroxylations, seules celles des molécules stéroïdiques font largement appel aux microorganismes. Par contre, les hydroxylations de composés aromatiques sont fréquemment étudiées en laboratoire mais les mises en oeuvre industrielles restent très rares.

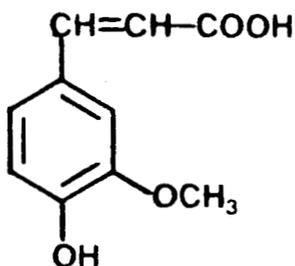
Pour introduire des groupes hydroxyles sur des molécules organiques, certaines réactions enzymatiques conduisent directement à la fixation d'un, ou des deux, atomes d'une molécule d'oxygène. Ces enzymes sont des oxygénases : si un seul atome est fixé nous sommes en présence de monooxygénases, si les deux le sont nous avons affaire à des dioxygénases ou oxygène-transférases. Dans ce dernier cas, les hydroxyles sont souvent portés par deux carbones adjacents.

Les monooxygénases ou hydroxylases ou oxygénases à fonction mixte incorporent un atome d'oxygène dans le substrat et réduisent le deuxième atome en formant de l'eau. Pour cette réduction un deuxième substrat doit intervenir comme donneur

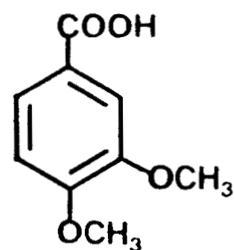
Planche I



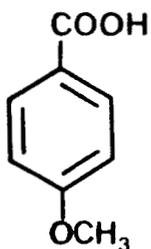
Acide 4-O-méthyl-gallique



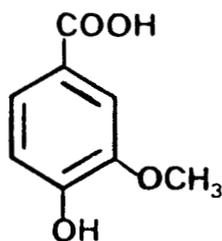
Ac. férulique



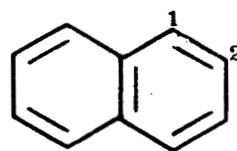
Ac. vératrylique



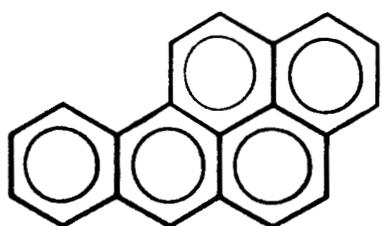
Ac. anisylque



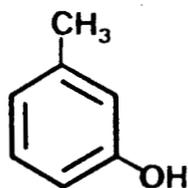
Ac. vanillique



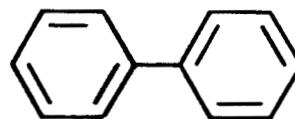
Naphtalène



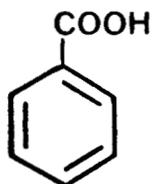
Benzo(a)pyrène



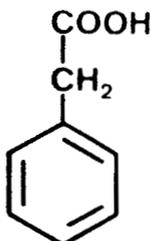
méta-crésol



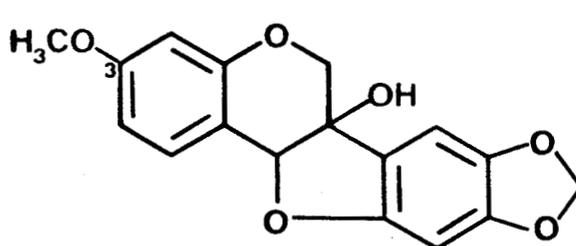
Biphényle



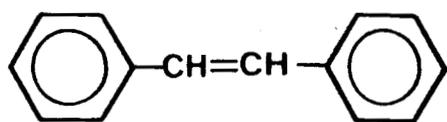
Ac. benzoïque



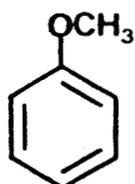
Ac. phényl-acétique



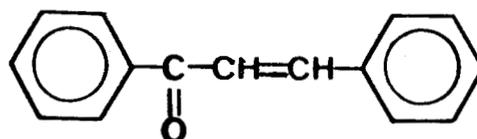
Pisatine



trans-stilbène



Anisole



Chalcone

d'électrons. Ce type d'enzymes comprend les monooxygénases à cytochrome P-450 fréquemment responsables des réactions d'hydroxylation des molécules hydrophobes.

En dehors d'une hydroxylation directe, les composés hydroxylés peuvent également être obtenus par O-déalkylation : de nombreux exemples de microorganismes capables de O-démétyler des composés aromatiques sont répertoriés dans la littérature .

GENERALITES SUR LES HYDROXYLATIONS ET LES O-DEMETHYLATIONS

KIESLICH (1976), dans son ouvrage sur les transformations microbiennes de composés cycliques, a répertorié un nombre élevé d'hydroxylation et de O-déméthylations aussi bien chez les bactéries que chez les champignons. Dans la planche I sont représentées les formules des molécules citées ci-après.

Une bactérie du sol, *Erwinia herbicola*, dégrade la bergénine en acide 4-O-méthylgallique puis O-déméthyle ce produit pour donner de l'acide gallique (MINAMIKAWA et coll., 1972). D'autres bactéries comme les *Pseudomonas* O-déméthylent en position 3 des composés comme les acides férulique, vanillique ou vératrylique (TOMS et WOOD, 1970 ; RIBBONS, 1970). Nous retrouvons parmi ces microorganismes ceux qui O-déméthylent la lignine. De même, CRAWFORD et coll. (1973) ont montré que *Nocardia corallina* hydroxyle et O-déalkyle en position 3 et 4 les acides anisylique et vératrylique, produits de dépolymérisation de la lignine.

Les champignons jouent un rôle majeur dans la dégradation des lignines, les capacités O-déméthylantes de nombreuses espèces ont été étudiées parmi lesquelles *Polyporus dichrous* (KIRK et LORENZ, 1974), *Phanerochaete chrysosporium* (TIEN et KIRK, 1983 ; GOLD et coll., 1984 ; ANDER et coll., 1985...), *Poria subacida*, *Pleurotus spp.*, *Polyporus spp.*,

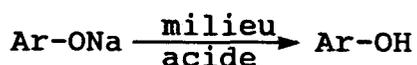
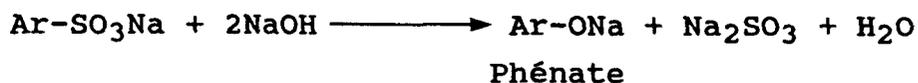
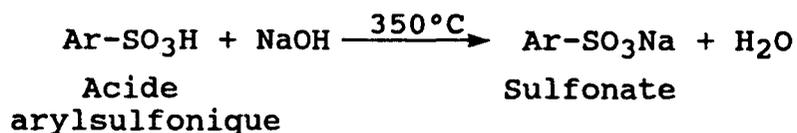
Trametes versicolor (TROJANOWSKI et HÜTTERMANN, 1987). KIRK et LORENZ (1974) ont montré que *Polyporus dichrous* peut O-déalkyler des éthers éthyliques, n-propyliques et isopropyliques de l'acide vanillique en plus des dérivés méthoxylés. Les systèmes enzymatiques impliqués sont des peroxydases ou des laccases. La lignine-peroxydase a la capacité de O-déméthyliser les méthoxybenzènes ; la laccase, quant à elle, n'est capable de O-déméthyliser que des méthoxyphénols (GALLIANO, 1989).

Les champignons peuvent introduire des groupements hydroxyles sur d'autres molécules que celles apparentées aux lignines. *Cunninghamella elegans* hydroxyle divers composés aromatiques tels que le naphthalène, transformé majoritairement en 1-naphtol (CERNIGLIA et GIBSON, 1978), le benzo(a)pyrène, oxydé en dérivés mono ou dihydroxylés et en quinones (CERNIGLIA et GIBSON, 1979 ; CERNIGLIA et coll., 1980), le biphényle, pour lequel les 2-, 3-, 4- et 44' hydroxybiphényles sont obtenus (DODGE et coll., 1979).

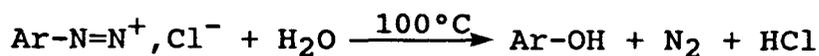
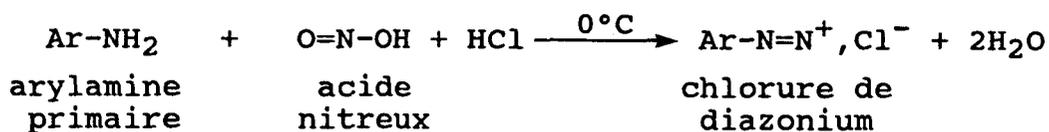
Le benzo(a)pyrène est également hydroxylé par *Aspergillus ochraceus* (GHOSH et coll., 1983), par *Neurospora crassa* et *Penicillium sp.* (KAPOOR et LIN, 1984) ou par une levure, *Saccharomyces cerevisiae*, qui hydroxyle aussi le biphényle (HONECK et coll., 1985).

En étudiant la voie de biosynthèse de la patuline par *Penicillium patulum*, MURPHY et LYNEN (1975) ont montré que le méta-crésol pouvait être hydroxylé en position 2 sur le cycle, soit directement pour donner le 2,5 dihydroxytoluène, soit après hydroxylation préalable de la chaîne latérale, pour former l'alcool gentisylique. L'hydroxylation de la chaîne latérale des composés aromatiques est une réaction parasite assez fréquente chez les champignons. Par exemple HOLLAND et coll., (1987) ont montré que *Mortierella isabellina*, *Cunninghamella echinulata* et *Helminthosporium sp.* hydroxylent en position benzylique l'éthylbenzène ou le 2 éthyl-naphtalène.

Planche II : Exemples de synthèse chimique des phénols.



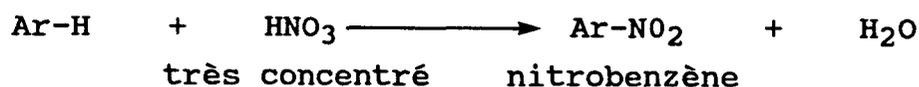
Fusion alcaline des acides arylsulfoniques.



Diazotation des amines aromatiques.



Préparation des acides arylsulfoniques.



Préparation des amines aromatiques primaires.

D'autres monooxygénases comme les tyrosinases catalysent l'ortho-hydroxylation des monophénols en diphénols qui s'oxydent ensuite en ortho-quinones (BOYER et coll., 1986). MATTHEWS et VAN ETTEN (1983) ont démontré qu'une monooxygénase à cytochrome P-450 O-déméthyle la pisatine. La pisatine est une phytoalexine synthétisée par le pois et accumulée sur le lieu d'attaque d'un microorganisme pathogène. Ce composé est toxique pour de nombreux champignons mais certains, comme *Nectria haematococca*, sont capables de le O-déméthyle. Cette O-déméthylation correspond à une réaction de détoxification, le produit phénolique étant moins toxique que la pisatine.

INTERET DES BIOCONVERSIONS

La préparation des phénols par voie chimique peut être réalisée par fusion alcaline des acides sulfoniques ou par diazotation des amines aromatiques (Planche II). Dans les 2 cas les conditions réactionnelles sont sévères, il faut en outre préalablement préparer soit l'acide arylsulfonique, soit l'amine aromatique primaire. De plus du point de vue des réactivités chimiques, les diverses positions du cycle sont en général comparables. A l'inverse, les systèmes enzymatiques, grâce à la structure tridimensionnelle du site catalytique, agissent avec une spécificité de position. Quant aux produits méthoxylés, la chimie les définit comme étant des éthers-oxydes : ce sont des composés relativement inertes chimiquement.

Pour illustrer la spécificité de position des systèmes enzymatiques nous pouvons citer en exemple le cas d'*Aspergillus niger* qui, en fonction de la structure de la molécule, hydroxyle différentes positions du cycle benzénique. Une étude sur la voie de métabolisation de l'acide mandélique a montré que l'acide benzoïque était para-hydroxylé (JAMALUDDIN et coll., 1970). Cette benzoate-para-hydroxylase a par la suite été purifiée (REDDY et VAIDYANATHAN, 1975), puis une optimisation de la production a été réalisée (VAN BALKEN et

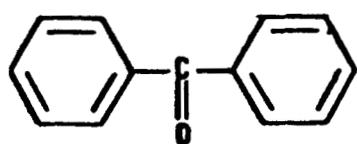
coll., 1987). L'acide phénylacétique est métabolisé par une préparation microsomale d'*Aspergillus niger* en son dérivé ortho-hydroxylé (SUGUMARAN et VAIDYANATHAN, 1979). BOCKS (1967) a montré avec des cellules entières que l'hydroxylation se poursuit sur la position 5 pour donner l'acide homogentisilique. Cet auteur a également mis en évidence que les isomères ortho sont les principaux produits d'hydroxylation de l'anisole et de l'acide phénoxyacétique. CLIFFORD et WOODCOCK (1964) avaient enregistré un résultat identique avec *Aspergillus niger* sur l'acide phénoxyacétique.

SMITH et ROSAZZA (1974) ont obtenu avec l'anisole des dérivés variés en fonction de la souche utilisée. Ces auteurs ont montré que leur souche d'*Aspergillus niger* n'hydroxyle pas l'anisole alors que *Penicillium chrysogenum* donne le dérivé 4-hydroxylé et que *Rhizopus stolonifer* forme le composé 2-hydroxylé. Un autre exemple est donné avec *Cunninghamella bainieri* qui peut dihydroxyler le trans-stilbène en position 4 et 4' alors qu'*Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* et *C. blakesleana* s'arrêtent à la mono-hydroxylation en position 4.

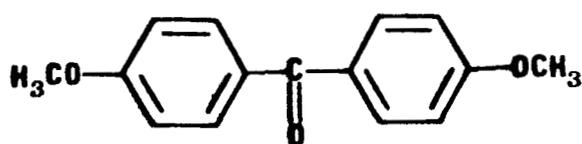
Enfin, certaines souches ne sont pas spécifiques d'une seule position : c'est le cas de la souche d'*Aspergillus niger* de SMITH et ROSAZZA (1974) qui hydroxyle le biphényle en position 2 et 4, mais ne forme pas le 4,4'-dihydroxybiphényle, tandis que la souche de DODGE et coll. (1979) n'est pas capable de transformer ce substrat. Pour réaliser une transformation donnée, un "screening" s'avère nécessaire afin de choisir la souche la plus appropriée.

Les bioconversions possèdent donc deux avantages essentiels sur les réactions chimiques : tout d'abord les conditions de réaction sont douces ce qui autorise la transformation de molécules plus ou moins fragiles qui seraient détruites par voie chimique ; ensuite la spécificité de position évite d'aboutir à des mélanges qu'il faudrait purifier par la suite.

Planche III : Les molécules modèles retenues pour notre étude.



Benzophénone



44' diméthoxybenzophénone

PRESENTATION DE L'ETUDE

En parfumerie et dans l'industrie pharmaceutique des molécules aromatiques hydroxylées sont très souvent retrouvées dans les principes actifs (molécules odorantes ou antibiotiques). De plus, "l'activité" de la molécule dépend fréquemment de la position sur laquelle est fixée le groupement hydroxyle. En outre ces molécules ont des structures complexes qui rendent encore plus délicate leur fonctionnalisation sur un site précis. Ces recherches ont été entreprises dans le but d'introduire spécifiquement en position 4 un groupement hydroxyle sur le noyau aromatique de molécules du type de la chalcone c'est-à-dire sur lesquelles une fonction cétone est fixée en position 1. Dans cette optique, 2 stratégies sont envisageables. La 1ère consiste à hydroxyler directement la molécule : la fonction hydroxyle doit donc être introduite en dernier lorsque tout le squelette de la molécule a été synthétisé. Dans ce cas les molécules étant complexes et fragiles, il faut trouver un organisme hautement spécifique pour éviter l'hydroxylation d'autres positions ou la transformation de la molécule.

Dans la seconde solution, le produit de départ est méthoxylé : tout au long de la synthèse le groupement hydroxyle est protégé et la réaction finale est une O-déméthylation. Dans ce cas, il faut trouver un organisme capable de réaliser ce type de réaction. Contrairement au cas précédent, cette dernière étape correspond à une réaction de déprotection et non à une fonctionnalisation.

La chalcone n'a pas été retenue comme molécule modèle en raison de son instabilité : elle se polymérise à la lumière et se dégrade très rapidement lorsqu'elle est introduite dans un milieu de culture. Les molécules modèles qui nous ont donc été fournies sont la benzophénone et son dérivé para-diméthoxylé la 44' diméthoxybenzophénone (Planche III).

Nous constatons que le groupement reliant les deux cycles aromatiques est une fonction cétone or celle-ci est un groupement accepteur orientant les substitutions suivantes vers la position méta ou position 3. D'autre part ces substituants "désactivent" le cycle et rendent les substitutions plus difficiles. Nous voyons donc que chimiquement la synthèse de 4 hydroxybenzophénone n'est pratiquement pas possible.

Notre travail s'est organisé autour de trois parties.

Dans la première, nous avons présenté les produits de réaction attendus et leurs méthodes de caractérisation. En vue du "screening", une méthode qualitative, rapide et fiable s'imposait. Puis, à la suite de ce "screening", nous avons sélectionné le substrat et la souche donnant les meilleurs résultats. Nous avons ensuite mis au point un dosage quantitatif destiné à étudier plus en détail la réaction retenue.

La deuxième partie est consacrée à l'étude de l'influence de divers facteurs sur la O-déméthylation. Nous avons fait varier le moment d'addition du substrat, les concentrations de mycélium et de substrat, la nature de la source carbonée et les conditions d'agitation et d'aération. Nous avons également étudié les conséquences de l'addition ou de l'absence de produits comme les détergents ou les oligoéléments.

Enfin dans la dernière partie, nous avons étendu l'étude des conditions de transformation à des fermenteurs de types et de formes divers et à des substrats nouveaux.

PREMIERE PARTIE**CHOIX DU SUBSTRAT, DE L'ESPECE FONGIQUE**
ET ETUDE QUANTITATIVE

Dans cette partie, le but est de sélectionner le substrat le plus approprié et le champignon assurant la meilleure bioconversion, puis de définir les conditions pour un dosage fiable. Ces points sont développés dans 3 chapitres :

Chapitre I : Caractérisation des produits de réaction et étude préliminaire

Chapitre II : Recherche de souches hydroxylantes ou O-déméthylantes

Chapitre III : Mise au point du dosage quantitatif

CHAPITRE I

CARACTERISATION DES PRODUITS DE REACTIONS ET ETUDE PRELIMINAIRE

1 - INTRODUCTION

Dans certaines réactions d'hydroxylation, l'activité du complexe enzymatique mis en jeu est fortement influencée par la lumière. C'est le cas de la cinnamate 4-hydroxylase, qui hydroxyle spécifiquement en position 4 le noyau aromatique de l'acide cinnamique. Cet enzyme pourrait intervenir dans la réaction que nous nous sommes proposés d'étudier puisqu'il est requis dans la première étape de la voie de biosynthèse des composés phénoliques conduisant à la lignine, aux esters d'acides caféiques et aux flavonoïdes à partir de la phénylalanine.

La cinnamate 4-hydroxylase n'est pas influencée par la lumière de la même façon suivant son origine, ainsi chez le Rutabaga HILL et RHODES (1975) ont montré qu'un éclaircissement en lumière blanche rendait réversible l'inhibition de cet enzyme par le CO, ce qui prouve, entre autres résultats, que celui-ci est une monooxygénase à cytochrome P-450.

Chez le pois, BENVENISTE et son équipe (1978) ont relevé un effet photostimulant : l'hydroxylation de l'acide cinnamique s'accomplit à l'obscurité mais la réaction est beaucoup plus efficace sous radiations rouges ($650\text{nm} < \lambda < 790\text{nm}$) ou bleues ($430\text{nm} < \lambda < 480\text{nm}$), ce qui semble indiquer une nette corrélation avec la photosynthèse.

Enfin avec des cultures d'épinard, feuilles matures ou jeunes plants, BOLWELL et BUTT (1983) ont obtenu une même augmentation de l'activité de la cinnamate 4-hydroxylase sous lumière blanche ou rouge.

Par contre, lorsque ce même enzyme est détecté dans des tissus non chlorophylliens comme les tubercules de pomme de terre, LAMB et RUBERY (1976a, b) ont montré une photoindifférence vis à vis de la lumière blanche : seule une activité de base est enregistrée. Dans ce cas les photorécepteurs indispensables au fonctionnement des cytochromes P-450, intervenant dans ce complexe enzymatique, font défaut dans les tissus non chlorophylliens des tubercules de pommes de terre.

Néanmoins l'influence de la lumière sur l'activité de la cinnamate 4-hydroxylase peut être constatée sur des organismes non chlorophylliens. En effet cet enzyme existe également chez les champignons, il a été mis en évidence chez un Basidiomycotiné : *Polyporus hispidus* (PERRIN et TOWERS, 1973). Sur ce même champignon VANCE et coll. (1973) ont montré que l'absence de lumière affectait sérieusement l'activité de cet enzyme. Ce résultat suggère donc la présence de photorécepteurs chez cet organisme.

D'autre part, l'influence du milieu de culture sur la croissance et la production d'enzymes de champignon a été étudiée depuis longtemps déjà. Par exemple le rôle de certains microéléments a souvent été rapporté. STEINBERG (1936) et ROGERS (1938) ont montré que la présence de molybdène influence positivement la croissance. YOUNG et BENNETT (1922) ainsi que

MULDER (1948) ont aussi relevé que cet oligoélément intervenait dans l'assimilation des sels de calcium et de potassium. Plus récemment, sur *Aspergillus niger*, NAUTIYAL et coll. (1988) ont constaté que les effets d'une déficience en fer étaient accentués en présence de faibles quantités de molybdène. Enfin, AGARWALA et coll. (1986a) ont montré sur des *Aspergillus*, dont *Aspergillus niger*, qu'une déficience en molybdène provoquait une diminution, non seulement de la croissance, mais aussi de l'activité de certains enzymes.

En ce qui concerne l'apport vitaminique, la thiamine se révèle parfois nécessaire pour une meilleure croissance. Cette vitamine peut jouer un rôle important aussi bien chez les Basidiomycotins (ROBBINS et KAVANAGH, 1951 ; COCHRANE, 1958), les Ascomycotins (FRIES, 1943) et les Deutéromycotins ou champignons imparfaits (MOSHER et coll., 1936).

Dans ce chapitre, nous avons donc étudié les effets de la lumière et de la nature du milieu de culture afin de déterminer les conditions minimales requises pour la culture des champignons, mais surtout pour l'hydroxylation ou la O-déméthylation de nos substrats. Avant d'exposer les résultats de ces études préliminaires, nous avons, dans un premier temps, présenté les différents produits susceptibles d'être formés au cours de la bioconversion de l'un ou l'autre des substrats. Dans un deuxième temps, nous avons précisé les méthodes de détection et de détermination de ces produits.

2 - PRESENTATION DES SUBSTRATS ET DES PRODUITS DE REACTION

2-1 : La benzophénone

Dans une molécule de benzophénone, chacun des 2 cycles aromatiques possède un axe de symétrie passant par le carbone 1 (carbone portant le carbonyle) et le carbone 4. Il en résulte que les positions 2 et 6, puis les positions 3 et 5, sont équivalentes. De plus, le groupement carbonyle

$\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix} \text{C=O}$ possède 2 substituants identiques, R_1 et R_2 . Il

en résulte que la molécule dans son ensemble est symétrique : l'hydroxylation de la position 2 ou celle de la position 2' donne le même produit, il en est de même avec celles des positions 3 et 3' etc... Cette double symétrie limite le nombre d'isomères de monohydroxylation à 3 (Figure I-1).

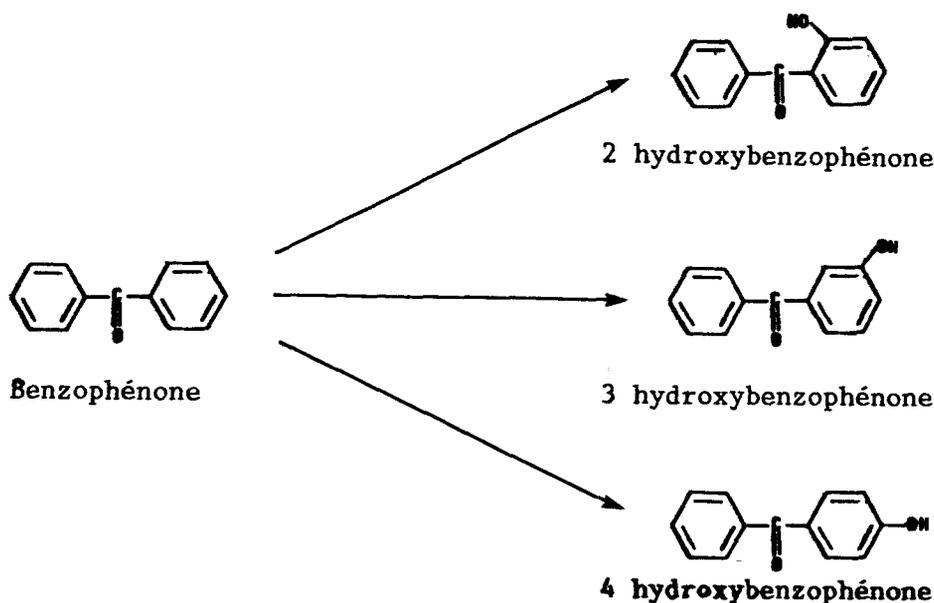


Figure I-1 : La benzophénone et ses produits de monohydroxylation.

Ces trois dérivés monohydroxylés peuvent à leur tour être hydroxylés. Les molécules n'étant plus symétriques, la deuxième fonction hydroxyle peut être greffée sur le même cycle que la première ou sur l'autre cycle; il se forme donc des isomères de deux types différents. Pour chacun d'eux, suivant la position de cette deuxième fonctionnalisation de nouveaux isomères sont générés. En conséquence, au stade de la dihydroxylation, un nombre important d'isomères peut, en théorie, être obtenu.

Comme nous l'avons exposé dans l'introduction générale, le "screening" aura pour but la recherche de souches capables d'hydroxyler d'abord la benzophénone en position 4 pour avoir la 4 hydroxybenzophénone puis ce dernier produit

pour arriver à la 44'dihydroxybenzophénone (44'diOH ou B) (Figure I-2).

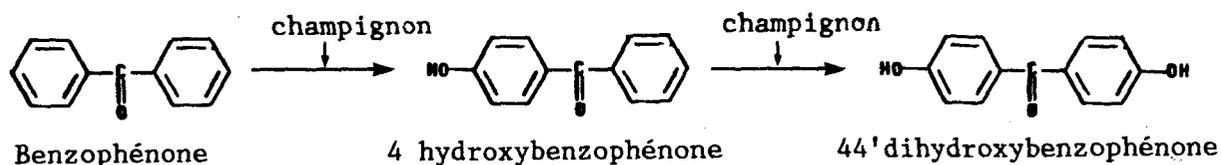


Figure I-2 : Suite d'hydroxylations spécifiquement recherchée.

2-2 : La 44'diméthoxybenzophénone

Ce deuxième substrat correspond au dérivé diméthoxylé en position 4 et 4' de la benzophénone. Dans ce cas, nous allons suivre une double réaction de O-déméthylation qui conduira à la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone puis, comme dans le paragraphe précédent à la 44'dihydroxybenzophénone (Figure I-3).

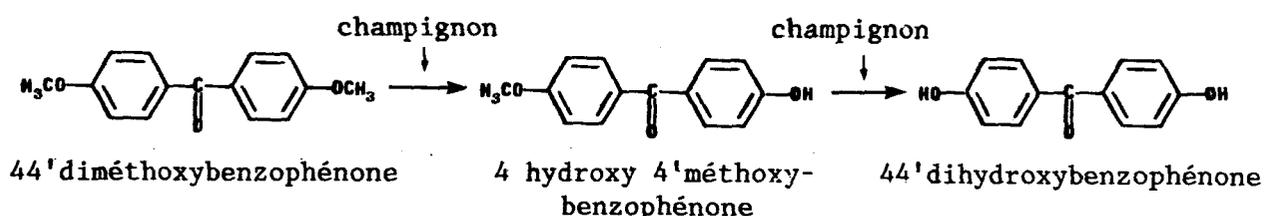


Figure I-3 : Double O-déméthylation de la 44'diméthoxybenzophénone.

Notre but reste l'obtention de fonctions hydroxylées sur les positions 4 des noyaux aromatiques. En fonctionnalisant la benzophénone sur ces deux positions, nous espérons trouver des espèces fongiques capables d'assurer une réaction de O-déméthylation. Les positions 4 étant seules méthoxylées, les champignons ne pourront plus former de

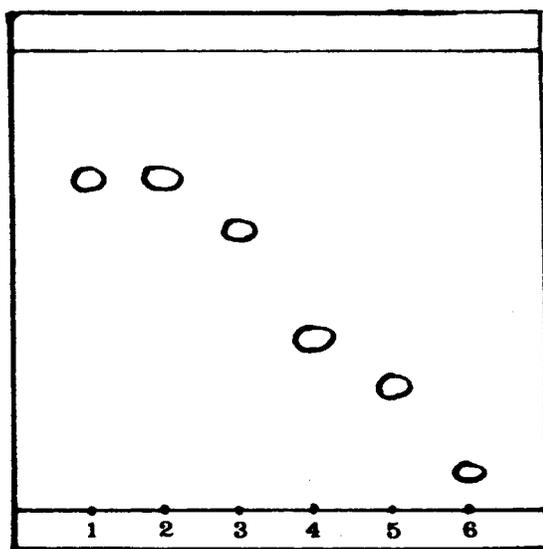


Figure I-4 : Profil migratoire de la benzophénone et de ses dérivés hydroxylés.

- | | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 : benzophénone | 4 : 3 hydroxybenzophénone |
| 2 : 2 hydroxybenzophénone | 5 : 4 hydroxybenzophénone |
| 3 : 2,2' dihydroxybenzophénone | 6 : 4,4' dihydroxybenzophénone |

fonctions hydroxyles que sur ces positions : les isomères sur les positions 2, 3, 5 et 6 seront ainsi évités. Pour atteindre cet objectif, il est impératif que les organismes fongiques ne possèdent pas, ou ne conservent pas, la faculté d'hydroxyler parallèlement d'autres positions du noyau aromatique.

3 - CARACTERISATION DES PRODUITS

Une méthode simple, rapide et sensible est nécessaire afin de tester un certain nombre de souches capables soit d'hydroxyler soit de O-déméthyle les deux substrats retenus. Ceux-ci et leurs produits de transformation ont des polarités différentes du fait de la présence ou non des groupements hydroxyles et méthoxyles. Il nous a semblé opportun de mettre en oeuvre une technique de chromatographie sur couche mince dont les conditions sont reportées dans l'annexe I-3.

3-1 : La benzophénone

Le profil migratoire de chacun des produits est donné dans la figure I-4, les Rf sont répertoriés dans le tableau I-1.

Tableau I-1 : Rf de la benzophénone et de ses dérivés hydroxylés.

Produits	Bzph	2 OH	22'diOH	3 OH	4 OH	44'diOH
Rf	0,72	0,72	0,61	0,37	0,27	0,07

Bzph = benzophénone
 2 OH = 2 hydroxybenzophénone
 3 OH = 3 hydroxybenzophénone
 4 OH = 4 hydroxybenzophénone
 22'diOH = 22'dihydroxybenzophénone
 44'diOH = 44'dihydroxybenzophénone

Nous constatons que dans le système de solvants

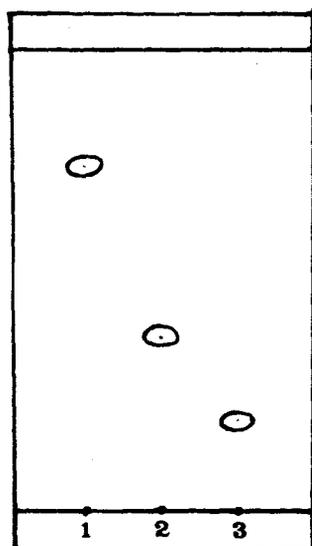


Figure I-5 : Profil migratoire de la 44' diméthoxybenzophénone
et de ses dérivés O-déméthylés.

- 1 : 44' diméthoxybenzophénone 3 : 44' dihydroxybenzophénone
2 : 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone

utilisé, la benzophénone et la 2 hydroxybenzophénone ont le même Rf. Néanmoins nous l'avons choisi car si d'autres systèmes de solvants permettaient de séparer ces deux produits, la 44' dihydroxybenzophénone, elle, restait sur la ligne de dépôt. De plus avec ces autres systèmes de solvants, il aurait été difficile d'affirmer qu'une hydroxylation était spécifique de la position 4 car les 3 et 4 hydroxybenzophénones étaient mal séparées.

En outre dans l'optique du "screening", nous ne cherchons ni à répertorier toutes les hydroxylations possibles de la benzophénone par les champignons, ni à calculer les rendements de la bioconversion : un champignon sera systématiquement rejeté s'il n'hydroxyle pas ce substrat ou s'il l'hydroxyle en position 2. Il n'est donc pas indispensable de connaître la nature exacte des produits formant la tache dont le Rf est égal à 0,72.

3-2 : La 44' diméthoxybenzophénone

Pour ce substrat et ces produits de réaction, nous avons dû mettre au point un autre système de solvants présentant une plus grande polarité (Annexe I-3). En effet avec celui utilisé pour la benzophénone, la 44' diméthoxybenzophénone migre assez loin mais elle donne un profil de traîne. Nous reportons dans la figure I-5 le profil migratoire obtenu avec le nouveau système de solvants. Les valeurs de Rf du substrat et des 2 produits de réaction sont indiquées dans le tableau I-2.

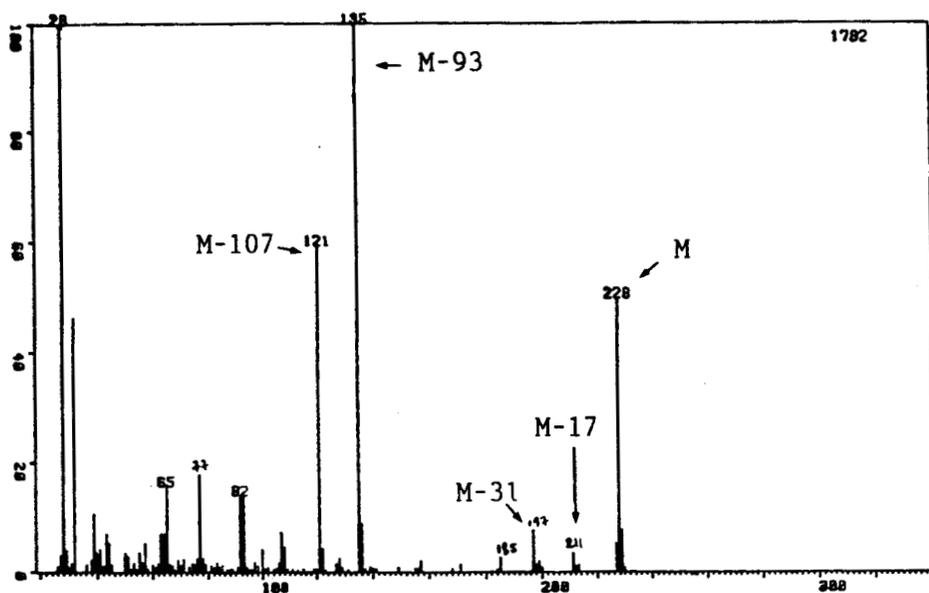


Figure I-6 : Spectre de masse du produit dont le Rf est égal à 0,37.

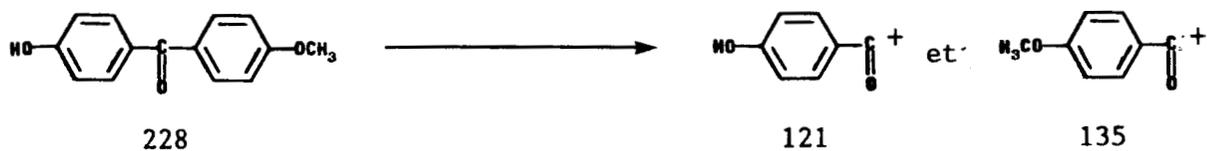


Figure I-7 : Fragmentation de la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone en spectrométrie de masse.

Tableau I-2 : Rf de la 44' diméthoxybenzophénone et de ses dérivés O-déméthylés.

Produits	S	A	B
Rf	0,75	0,37	0,19

S = 44' diméthoxybenzophénone

A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone

B = 44' dihydroxybenzophénone

Dans ce système de solvant, les taches chromatographiques sont suffisamment séparées, les deux réactions de O-déméthylation pourront être suivies.

3-3 : Vérification de la structure des produits

Avec différentes souches et notamment *Aspergillus niger*, nous avons obtenu des taches dont les Rf sont aussi égaux à 0,37 et 0,19. Afin de vérifier la structure de ces produits, nous les avons étudiés en spectrométrie de masse⁽¹⁾.

Pour le produit avec un Rf égal à 0,37, le rapport m/z ayant le nombre de masse le plus élevé est de 228 (Figure I-6). Cet ion M⁺ donne la masse moléculaire du produit qui est identique à celle de la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone. La fragmentation de la molécule analysée donne 2 pics intenses. Le 1er, à 135, correspond à un ion de type phénone méthoxylée ; le 2ème, à 121, correspond à un ion de type phénone hydroxylée. Ces deux valeurs m/z permettent de déterminer les deux parties de la molécule (Figure I-7). Ces structures sont confirmées par les ions m/z 211 et m/z 197. La perte de 17 unités impose celle d'un OH tandis que la perte de 31 unités impose celle d'un OCH₃. Ce spectre de masse prouve que le produit observé avec un Rf égal à 0,37 est bien la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone.

(1) Les spectres de masse ont été aimablement réalisés par le Service d'Analyse du Groupement de Recherche de Lacq.

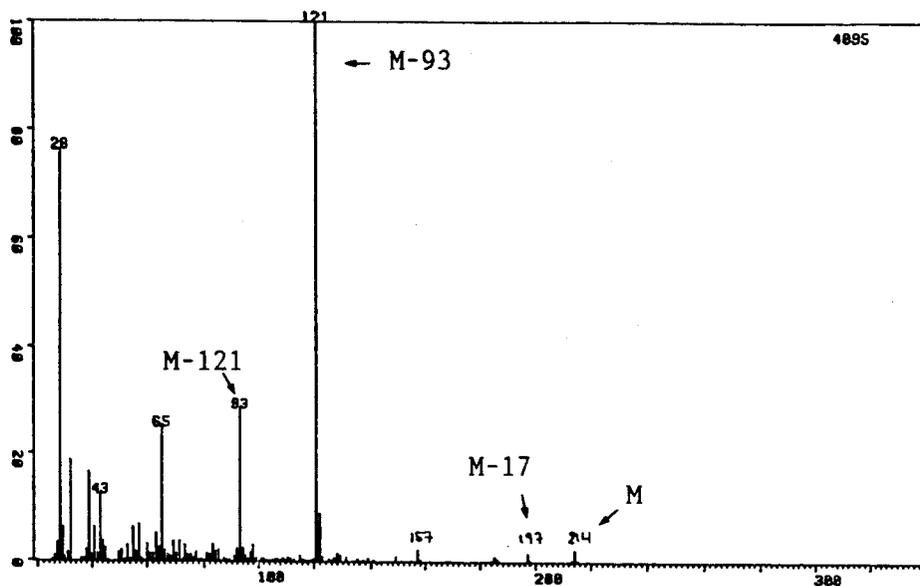


Figure I-8 : Spectre de masse du produit dont le Rf est égal à 0,19.



Figure I-9 : Fragmentation de la 4,4' dihydroxybenzophénone en spectrométrie de masse.

Pour le produit dont le Rf est égal à 0,19, les pics à 135 et 211 ont disparu (Figure I-8) : la fonction méthoxyle n'existe plus. Par contre, la partie hydroxylée de la molécule est toujours présente puisque nous avons toujours les ions m/z 121 et m/z 197. L'ion m/z 93 correspond à un ion de type phényle (Figure I-9). Il était présent dans le spectre de masse du produit dont le Rf est égal à 0,37, mais avec une intensité moitié moindre. La masse moléculaire est donnée grâce au pic M à 214 qui est très faible : les phénols, qui subissent facilement la fragmentation, donnent souvent un tel résultat. La fragmentation obtenue et la masse moléculaire constatée nous permettent d'affirmer que ce produit est bien la 44' dihydroxybenzophénone.

Les méthodes de détection étant clairement établies, nous pouvons aborder les études sur l'influence de la lumière et du milieu de culture.

4 - ETUDE PRELIMINAIRE

Notre travail impliquait la recherche de souches capables de produire de la 44' dihydroxybenzophénone à partir d'un substrat facilement disponible. Mais cette sélection de souches devait se faire dans des conditions bien déterminées, permettant en particulier d'éliminer les interférences substrat/milieu/produit/microorganisme. Il nous a semblé nécessaire, en utilisant quelques champignons choisis arbitrairement à partir de la bibliographie, de définir les paramètres précis qui seraient utilisés lors de la recherche et de la sélection de souches qui sera exposée dans le chapitre suivant.

Les conditions initiales de culture et de bioconversion sont présentées respectivement dans les annexes I-1 et I-2.

Tableau I-3 : Influence de l'éclairément sur la bioconversion de la benzophénone.

Temps de contact	24 h		48 h		72 h		96 h	
	Lum.	Obsc.	Lum.	Obsc.	Lum.	Obsc.	Lum.	Obsc.
Phanerochaete chrysosporium	3 OH 4 OH	0	3 OH 4 OH	0	3 OH 4 OH	0	3 OH 4 OH	0
Psilocybe cubensis ATCC 38882	3 OH 4 OH	0	3 OH 4 OH	0	/	/	/	/
Naematoloma fasciculare 1	3 OH 4 OH	(±)3 OH (±)4 OH	3 OH 4 OH	(±)3 OH (±)4 OH	/	/	/	/
Poria viridens	0	0	3 OH 4 OH	0	3 OH 4 OH	0	3 OH 4 OH	0
Aspergillus niger 1	0	0	0	0	0	0	0	0
Poria vaillantii	0	0	0	0	3 OH 4 OH	0	3 OH 4 OH	0

Estimation à partir de CCM. La quantité de benzophénone restante n'est pas indiquée. Lum. = essai à la lumière, Obsc. = essai à l'obscurité, 3 OH = 3 hydroxybenzophénone, 4 OH = 4 hydroxybenzophénone, 0 = aucun produit, / = essai non effectué. Quantité de 3 OH (ou 4 OH) : (±) = faible, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée comme moyenne.

4-1 : Influence de la lumière

Nous avons déterminé l'influence sur les transformations de la benzophénone et de la 44' diméthoxybenzophénone.

4-1-1 : Effet sur la transformation de la benzophénone

Nous constatons que la lumière est indispensable pour 4 des 5 champignons transformant ce substrat (Tableau I-3). *Naematoloma fasciculare* 1 est le seul qui hydroxyle la benzophénone à la lumière comme à l'obscurité. Toutefois dans ce dernier cas, l'intensité des taches chromatographiques est moindre, la réaction est donc moins efficace. Ce résultat est en accord avec ceux de VANCE et coll. (1973), HILL et RHODES (1975), BENVENISTE et coll. (1978).

Nous remarquons que la souche d'*Aspergillus niger* n'a pas la capacité d'hydroxyler la benzophénone en position 3 ou 4.

Quatre souches n'hydroxylent pas la benzophénone à l'obscurité ; pour expliquer cela trois hypothèses peuvent être émises :

- les quantités de produits hydroxylés formées à l'obscurité restent faibles et ne sont pas détectables par notre méthode d'analyse,

- la réaction est plus lente à l'obscurité et les essais n'ont pas été poursuivis suffisamment longtemps pour voir apparaître les produits,

- l'enzyme ou le complexe enzymatique mis en jeu dans cette réaction est photoinduit c'est-à-dire strictement tributaire d'une radiation lumineuse.

La première hypothèse est assez peu vraisemblable. En effet les méthodes de détection par chromatographie sur couche mince avec indicateur de fluorescence sont connues pour

Tableau I-4 : Influence de l'éclairément sur la bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone.

Organismes	24 h		48 h		72 h		96 h	
	Lum.	Obsc.	Lum.	Obsc.	Lum.	Obsc.	Lum.	Obsc.
<i>Stropharia rugoso annulata</i>	A PP	A PP	A PP	A PP	A (±) B	A (±) B	(±) A (±) B	(±) A (±) B
<i>Poria viridens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger 1</i>	(++) A (±) B	(++) A (±) B	(++) A (+) B					

Estimation à partir de CCM. La quantité de 44' diméthoxybenzophénone restante n'est pas indiquée.
 Lum. = essai à la lumière, Obsc. = essai à l'obscurité, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone,
 B = 44' dihydroxybenzophénone, PP = composés à Rf < 0,19, 0 = aucun produit. Quantité de A, B, ou
 PP : (±) = faible, (+) = forte, (++) = très forte, en l'absence d'indication devant le symbole du
 produit, la valeur est considérée comme moyenne.

leur grande sensibilité. Par contre, il est possible qu'en augmentant la durée de la bioconversion nous finissions par voir apparaître les produits de réaction. Dans ce cas la lumière agirait comme un stimulateur de la réaction. Enfin dans la dernière hypothèse, la lumière n'aurait plus une simple action stimulatrice mais serait indispensable à la bioconversion. Aucun effet négatif, comme une inhibition de la réaction, n'ayant été constaté nous avons décidé que les essais d'hydroxylation de la benzophénone seraient réalisés sous lumière blanche pour éviter des résultats faussement négatifs.

4-1-2 : Effet sur la transformation de la 44' diméthoxybenzophénone

Pour des raisons techniques les premiers essais avaient été faits à l'obscurité et nous avons obtenu des résultats positifs. Toutefois, nous avons vérifié si ce facteur avait une influence éventuelle sur la O-déméthylation. Au vu du tableau I-4, nous constatons que l'éclairement des fioles ne perturbe pas la réaction. Les travaux de KIRK et LORENZ (1974) ainsi que ceux de ANDER et coll. (1985) ne signalaient pas l'utilisation de radiations lumineuses pour des réactions de O-déméthylation. Contrairement aux essais de transformation de la benzophénone, nous poursuivrons notre recherche de souches à l'obscurité pour d'évidentes raisons de commodité.

Enfin nous remarquons que *Poria viridens* peut transformer la benzophénone mais n'est pas capable de O-démétyler la 44' diméthoxybenzophénone alors que l'inverse est observé pour *Aspergillus niger*. Ces 2 résultats laissent supposer que les systèmes enzymatiques mis en jeu dans ces deux réactions sont différents.

4-2 : Influence du milieu de culture

Cette étude a porté sur deux milieux. Le premier est un milieu semi-synthétique appelé milieu L de ODDOUX

Tableau I-5 : Influence du milieu de culture sur la bioconversion de la benzophénone.

Temps de contact	24 h		48 h		72 h		96 h	
	L de ODDOUX	Synth.	L de ODDOUX	Synth.	L de ODDOUX	Synth.	L de ODDOUX	Synth.
<i>Poria viridens</i>	0	0	(±) 3 OH	(±) 3 OH	3 OH	3 OH	3 OH	3 OH (±) 4 OH
<i>Poria vaillantii</i>	0	0	0	0	(±) 3 OH (±) 4 OH	(±) 3 OH (±) 4 OH	3 OH 4 OH (±) 44'diOH	3 OH 4 OH
<i>Naematoloma fasciculare</i> 2	0	0	(±) 44'diOH	(±) 44'diOH	(±) 44'diOH	(±) 44'diOH	0	0

Estimation à partir de COI. La quantité de benzophénone restante n'est pas indiquée. Synth. = milieu synthétique, 3 OH = 3 hydroxybenzophénone, 4 OH = 4 hydroxybenzophénone, 44'diOH = 44' dihydroxybenzophénone, 0 = aucun produit. Quantité de 3 OH, 4 OH ou 44'diOH : (±) = faible, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée comme moyenne.

(Annexe I-1), plus particulièrement adapté aux Basidiomycotins, or la plupart des souches testées sont issues de cet embranchement. Le deuxième contient de la thiamine et différents oligoéléments comme du molybdène, du cobalt, du sodium, de l'aluminium, du bore, en concentrations déterminées (Annexe I-4). Ce milieu synthétique, précisément défini, tamponné à pH 4,5 avec du tampon acétate 10mM, est dérivé d'un milieu retenu pour les études concernant la lignolyse (KIRK et coll. 1978). Or celle-ci fait fréquemment intervenir des réactions d'hydroxylation ou de O-déméthylation.

4-2-1 : Effet sur la transformation de la benzophénone

Trois souches ont été testées avec la benzophénone sur les 2 milieux de culture retenus. Il s'agit de *Poria viridens*, *Poria vaillantii*, *Naematoloma fasciculare* 2. Les résultats sont reportés dans le tableau I-5. Pour *Poria viridens* la 3 hydroxybenzophénone commence à apparaître en 48 heures sur les 2 milieux de culture, alors que pour *Poria vaillantii* il faut attendre 72 heures pour voir un début de formation de 3 et de 4 hydroxybenzophénones. Quant à *Naematoloma fasciculare* 2, le seul produit présent en faible quantité est la 44' dihydroxybenzophénone qui a disparu en 96 heures dans l'un et l'autre milieux.

Si nous comparons ces résultats avec ceux présentés dans le tableau I-3 nous remarquons que pour une même souche les produits sont identiques mais leurs moments d'apparition varient.

Quel que soit le milieu, les résultats sont similaires, nous pouvons en conclure que les différences de composition relevées dans ces deux milieux influent assez peu sur la bioconversion de la benzophénone. L'extrait de malt et l'hydrolysate de caséine présents dans le milieu L de ODDOUX remplacent avantageusement les solutions de vitamines et d'oligoéléments du milieu de culture synthétique. Ce milieu L

Tableau I-6 : Influence du milieu de culture sur la bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone.

Temps de contact	24 h		48 h		72 h		96 h	
	L de ODDOUX	Synth.	L de ODDOUX	Synth.	L de ODDOUX	Synth.	L de ODDOUX	Synth.
<i>Stropharia rugoso annulata</i>	A PP	A PP	A PP	A PP	A (±) 0,25 (±) B PP	A (±) 0,25 PP	A (±) 0,25 (±) B PP	A (±) 0,25 (±) B PP
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	(±) A PP	(±) A PP	(±) A PP	(±) A PP	(±) A (±) 0,25 (±) B PP	(±) A PP	(±) A (±) 0,25 (±) B PP	(±) A PP
<i>Naematoloma fasciculare</i> 1	PP	PP	(±) A PP	(±) A PP	(±) A (±) B PP	(±) A PP	(±) A (±) B PP	(±) A PP

Estimation à partir de CCM. La quantité de 44' diméthoxybenzophénone restante n'est pas indiquée.
 Synth. = milieu synthétique, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone,
 PP = composés à Rf < 0,19, 0,25 = composé avec ce Rf, 0 = aucun produit. Quantité de A, B, PP ou
 0,25 : (±) = faible, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée
 comme moyenne.

mis au point par ODDOUX (1957) pour la croissance des Basidiomycotins est aussi adapté à notre étude sur l'hydroxylation de la benzophénone et sera utilisé lors du "screening" de souches.

4-2-2 : Effet sur la transformation de la 44' diméthoxybenzophénone

L'influence du milieu de culture sur la transformation de la 44' diméthoxybenzophénone est étudiée avec *Stropharia rugoso annulata*, *Naematoloma fasciculare* 1, et *Phanerochaete chrysosporium* (Tableau I-6).

Avec *Stropharia rugoso annulata* et *Phanerochaete chrysosporium* la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone apparaît après 24 heures de contact alors qu'avec *Naematoloma fasciculare* 1 24 heures supplémentaires sont nécessaires. Le produit dihydroxylé apparaît en 72 heures avec les 3 souches dans les essais en milieu L de ODDOUX tandis qu'en milieu synthétique ce produit apparaît 24 heures plus tard, en 96 heures, seulement chez *Stropharia rugoso annulata*.

Cette difficulté d'apparition de la 44' dihydroxybenzophénone laisse supposer que certains microéléments ou vitamines sont présents à l'état de traces dans le milieu L de ODDOUX et manquent dans le milieu synthétique précisément défini. Nous pouvons aussi envisager que les proportions entre les différents constituants du milieu L de ODDOUX sont plus adaptées à la réaction de O-déméthylation. Quant aux quantités produites, elles sont identiques sur les deux milieux. Nous nous servons donc du milieu L de ODDOUX pour tester les Basidiomycotins avec la 44' diméthoxybenzophénone.

5 - CONCLUSION

Dans ce chapitre nous avons d'abord sélectionné et

adapté une méthode simple, rapide et facile à mettre en oeuvre, la chromatographie sur couche mince. Nous avons également confirmé la structure des produits de réaction de la 44' diméthoxybenzophénone, en les analysant par spectrométrie de masse.

Ensuite, au cours d'une étude préliminaire, nous nous sommes intéressés aux effets de la lumière et de la composition du milieu de culture sur les transformations des deux substrats testés.

Nous avons vu que pour hydroxyler la benzophénone, une énergie lumineuse, sous forme de lumière blanche, semble la plupart du temps indispensable. Une des souches hydroxyle la benzophénone à l'obscurité mais les quantités de produits formées sont plus faibles : grâce à la lumière la réaction est stimulée. A l'inverse pour la O-déalkylation de la 44' diméthoxybenzophénone, un éclaircissement en lumière blanche n'apporte aucune amélioration, nous avons donc réalisé les essais à l'obscurité.

Le milieu L de ODDOUX préconisé pour la croissance des Basidiomycotins, s'est révélé être également un milieu permettant l'hydroxylation de la benzophénone et la O-déméthylation de la 44' diméthoxybenzophénone. On aurait pu supposer que l'utilisation du milieu synthétique adapté aux études sur la biodégradation des lignines aurait pu faciliter les réactions de O-déméthylation puisque dans le processus de lignolyse des réactions de ce type interviennent. Or avec ce milieu, la O-déméthylation de la 44' diméthoxybenzophénone est moins efficace qu'en milieu L de ODDOUX. Nous avons donc retenu ce dernier milieu pour tester les Basidiomycotins.

Cette étude préliminaire nous a permis d'établir les conditions opératoires minimales pour la bioconversion des deux substrats testés. Nous pouvons maintenant effectuer un "screening" qui aboutira au choix du substrat et de l'espèce fongique répondant le mieux au but fixé : l'obtention d'un composé aromatique spécifiquement hydroxylé en position 4.

CHAPITRE II

RECHERCHE DE SOUCHES HYDROXYLANTES OU O-DEMETHYLANTES

1 - INTRODUCTION

Une recherche bibliographique nous a permis de choisir comme point de départ un certain nombre de souches connues pour hydroxyler ou O-déméthyleur des composés aromatiques.

KIESLICH (1976) a réalisé un important travail de synthèse répertoriant les différentes transformations, dont les hydroxylations et les O-déméthylations de molécules non stéroïdiennes par divers microorganismes.

Des travaux sur des substrats donnés ont conduit certains auteurs à rechercher des champignons capables d'opérer de telles transformations.

Parmi les espèces fongiques hydroxylant en méta l'acide phénylacétique, KOHMOTO et coll. (1970) ont trouvé *Aspergillus niger*, 4 espèces d'*Alternaria*, un *Rhizopus* et *Botrytis cinerea*.

L'hydroxylation du groupement naphtyle a été étudiée par BOLLAG et LIU (1972) au cours de leurs travaux sur l'hydroxylation d'un pesticide, le carbaryl. Ils ont testé 18 souches de champignons dont 5 *Aspergillus*, 1 *Rhizopus* et *Trichoderma viride*.

SMITH et ROSAZZA (1974) ont étudié l'hydroxylation et la O-déméthylation de plusieurs composés aromatiques mono-ou poly-cycliques fonctionnalisés ou non. Deux *Aspergillus* et un *Rhizopus* réalisent ce type de réaction. LIPAUSKA et coll. (1982) ont également montré que des *Rhizopus* possèdent des activités hydroxylantes et plus récemment, OUAZZANI et coll. (1991) ont utilisé *Rhizopus arrhizus* pour hydroxyler des dérivés des octalines.

De nombreuses Agaricales (*Agaricus*, *Naucaria*, *Naematoloma*, *Panaeolus*, *Psilocybe* et *Stropharia*) sont connues pour hydroxyler différents composés aromatiques mais la plupart du temps il s'agit de composés stéroïdiens (ROLAND ET WEINER, 1955 ; SCHUYTEMA et coll. 1963).

Les réactions de délignification débutent généralement par hydroxylation ou O-déméthylation des noyaux aromatiques. Nous avons donc sélectionné des champignons lignivores comme *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus* sp., *Poria* sp. déjà cités dans la littérature (ANDER et coll., 1985 ; HAARS et coll., 1986 ; TROJANOWSKI et HÜTTERMANN, 1987). Antérieurement des *Polyporus* avaient aussi été présentés comme étant capables d'hydroxyler l'acide cinnamique (VANCE et coll., 1973) et de O-déalkyler des acides alkoxybenzoïques (KIRK et LORENZ, 1974).

Trichoderma viride, déjà cité dans l'étude sur le carbaryl, a également été signalé par KAPOOR et LIN (1984) dans une étude sur le benzo(a)pyrène.

Enfin le genre *Aspergillus* a fait l'objet de

nombreuses études : *Aspergillus ochraceus*, grâce à un enzyme à cytochrome P-450, hydroxyle le benzo(a)pyrène (GHOSH et coll., 1983 ; DUTTA et coll., 1983), *Aspergillus sojae* dégrade l'acide benzoïque en ses dérivés méta et para-hydroxylés (YUASA et coll., 1975) et différentes espèces d'*Aspergillus* transforment des composés aromatiques issus de la dégradation des lignines (MILSTEIN et coll., 1983).

Cette revue bibliographique est loin d'être exhaustive, mais présente, par quelques exemples précis, les différentes potentialités biodégradatives des champignons filamenteux.

Les champignons sont testés en fioles d'Erlenmeyer dans les conditions énoncées en annexe I-1. Les Basidiomycotins sont cultivés sur milieu L de ODDOUX (1957), les autres champignons sont ensemencés sur le milieu synthétique décrit par MORQUER (1931) modifié par FAYRET (1975).

L'addition de substrat au milieu de culture marque le début de la réaction de bioconversion (Annexe I-2). A intervalles de temps réguliers, nous récoltons les filtrats de culture des différentes souches et nous caractérisons par CCM les produits formés. Les essais avec la benzophénone sont conduits à la lumière tandis que ceux avec la 44' diméthoxybenzophénone le sont à l'obscurité.

Les souches utilisées proviennent toutes de la mycothèque du laboratoire de Cryptogamie de l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

2 - RECHERCHE DE SOUCHES HYDROXYLANT LA BENZOPHENONE

2-1 : Présentation des souches

La majorité des souches testées sont des Basidiomycotins appartenant aux ordres des Agaricales et des

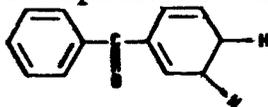
Polyporales. Ces souches sont répertoriées dans le tableau II-1.

Tableau II-1 : Souches testées avec la benzophénone.

Basidiomycotins	Agaricales	<i>Psilocybe cubensis</i> ATCC 38882 <i>Psilocybe atrorufa</i> <i>Psilocybe coprophila</i> <i>Maenatoloma capnoides</i> <i>Maenatoloma fasciculare</i> 1 <i>Maenatoloma fasciculare</i> 2 <i>Maenatoloma fasciculare</i> 3 <i>Stropharia rugoso annulata</i> <i>Stropharia aeruginosa</i> <i>Irpex lacteus</i>
	Polyporales	<i>Polyporus</i> sp. <i>Polyporus arcularius</i> <i>Polyporus brumalis</i> <i>Polyporus obtusus</i> 1 <i>Inonitus tamaritis</i> <i>Poria vaillantii</i> <i>Poria viridens</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725
Deutéromycotins	Hyphales	<i>Aspergillus niger</i> 1

2-2 : Résultats et discussion

Les résultats sont reportés dans la figure II-1. Hormis les 3 et 4 hydroxybenzophénones, un composé que nous avons nommé H, revient souvent avec une intensité moyenne. Son Rf est de 0,66 et l'analyse en spectrométrie de masse a montré qu'il s'agit d'une benzophénone dont un des cycles est partiellement hydrogéné



Sous le terme général "benzophénones pluri-hydroxylées" (BPH), nous avons regroupé les constituants dont les Rf sont compris entre 0,07 (4,4' dihydroxybenzophénone) et 0,27 (4 hydroxybenzophénone). Ces produits sont donc plus polaires que la benzophénone monohydroxylée la plus polaire (4 hydroxybenzophénone) et moins polaires que la benzophénone

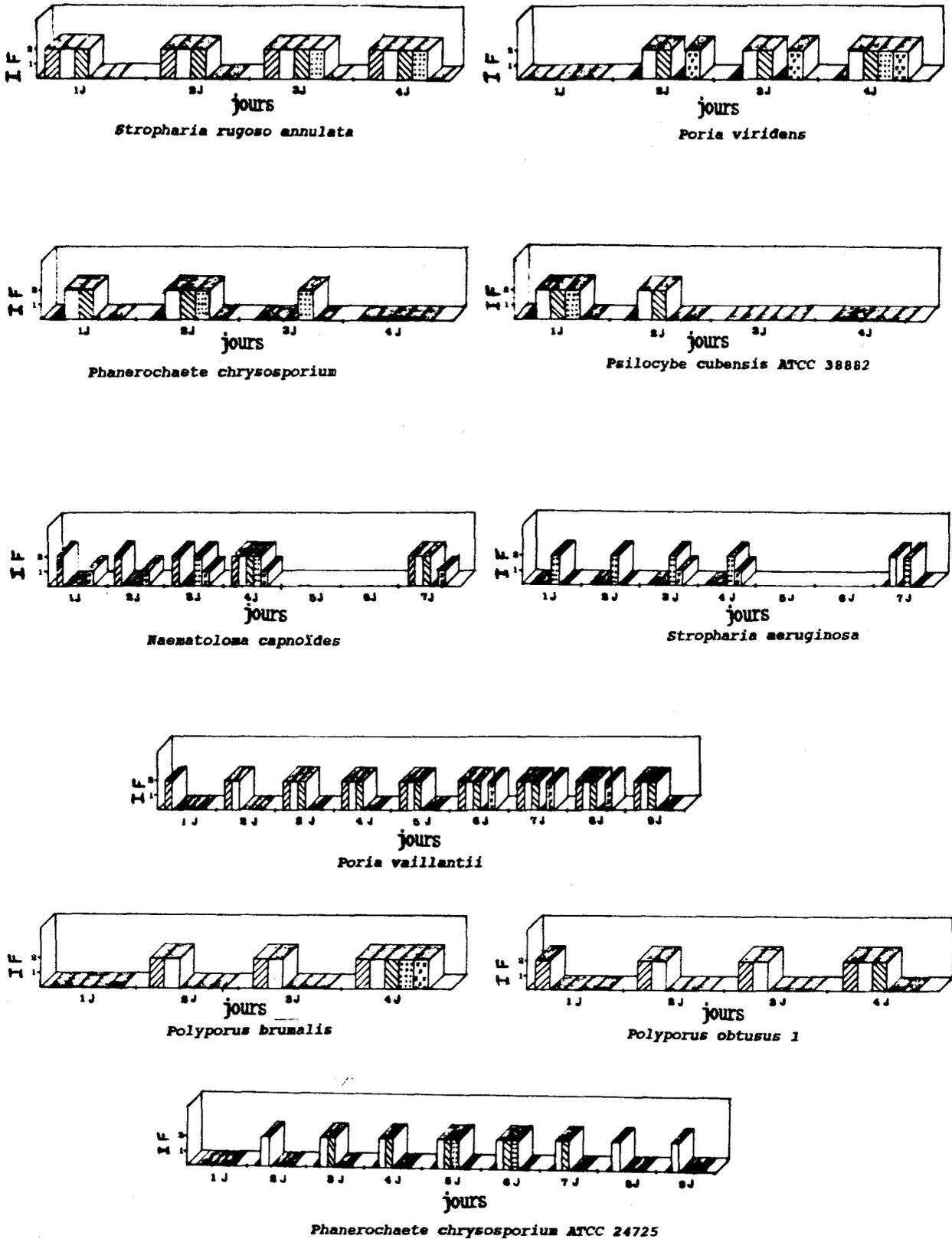


Figure II-1 : Bioconversion de la benzophénone avec diverses souches de champignon.

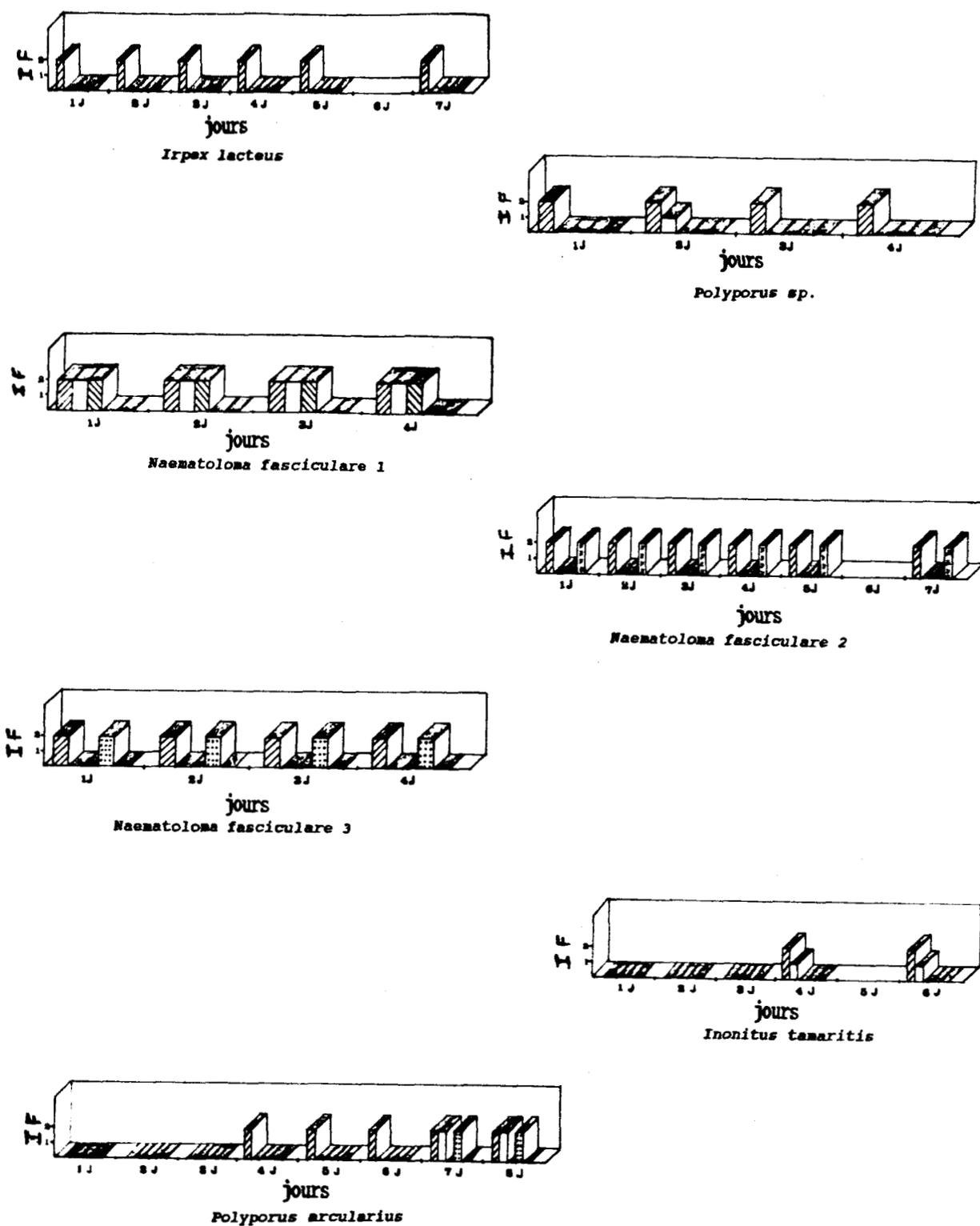


Figure II-1 : Bioconversion de la benzophénone avec diverses souches de champignon.

Estimation à partir de CCM. ▨ = produit dont le Rf=0,66, □ = 3 hydroxybenzophénone, ▤ = 4 hydroxybenzophénone, ▥ = benzophénones pluri-hydroxylées, ▧ = 44' dihydroxybenzophénone. Quantités de produits : 1 = faible, 2 = moyenne.

dihydroxylée la plus polaire (la 44' dihydroxybenzophénone).

Ces valeurs de Rf permettent de supposer la formation de benzophénones dihydroxylées autres que la 44' dihydroxybenzophénone et éventuellement de benzophénones trihydroxylées. Pour les benzophénones dihydroxylées, les 2 fonctions hydroxyles peuvent être greffées sur le même cycle ou chacune sur un cycle sauf sur les positions 2 et 2' puisque la 22'dihydroxybenzophénone est moins polaire que la 4 hydroxybenzophénone . Par contre si la 22'dihydroxybenzophénone est de nouveau hydroxylée, nous aurons des benzophénones trihydroxylées dont les Rf doivent être intermédiaires à ceux de la 4 hydroxybenzophénone et de la 44'dihydroxybenzophénone.

Les souches ont été classées en fonction des types de réponses obtenus.

Dans un 1er groupe nous avons répertorié les souches ne dégradant pas la benzophénone. Elles sont au nombre de trois il s'agit de *Psilocybe atrorufa*, *Psilocybe coprophila* et *Aspergillus niger* 1. Egalement avec une souche d'*Aspergillus niger*, DODGE et coll., (1979) n'ont pas obtenu l'hydroxylation du biphényle. Par contre, SMITH et ROSAZZA (1974) ont obtenu du 2 et du 4 hydroxybiphényle avec une autre souche de la même espèce : l'origine de la souche a donc toute son importance. L'hydroxylation d'un groupement naphtyle peut aussi être réalisée par *Aspergillus niger* (BOLLAG et LIU, 1972).

Dans le 2ème ensemble nous avons regroupé les champignons qui synthétisent en même temps et en premier la 3 et la 4 hydroxybenzophénone. Dans ce groupe la réaction évolue soit vers l'apparition de benzophénones plurihydroxylées comme pour *Stropharia rugoso annulata* et *Poria viridens*, soit vers la disparition des produits comme pour *Phanerochaete chrysosporium* et *Psilocybe cubensis* ATCC 38882. Ce dernier peut donc hydroxyler la benzophénone en positions 3 et 4 alors que les 2 autres *Psilocybe* testés n'en sont pas capables. Nous en déduisons que des champignons appartenant à

un même genre peuvent ne pas présenter le même type de réponse.

Deux souches appartiennent au 3ème groupe : *Naematoloma capnoïdes* et *Stropharia aeruginosa*. Ces champignons se caractérisent par la production d'une benzophénone dihydroxylée, la 44' dihydroxybenzophénone, avant les benzophénones monohydroxylées. Nous pouvons expliquer ce résultat par une transformation rapide de la benzophénone en début de bioconversion, puis par une diminution de la vitesse de réaction qui laisse apparaître les benzophénones monohydroxylées.

Avec les souches du 4ème groupe nous pouvons suivre, de jour en jour, les différentes étapes de l'hydroxylation de la benzophénone. Il se forme d'abord une benzophénone monohydroxylée, la 3 hydroxybenzophénone, ensuite il apparaît la 4 hydroxybenzophénone enfin il y a production de benzophénones pluri-hydroxylées. Ce groupe est constitué de *Poria vaillantii*, *Polyporus brumalis*, *Polyporus obtusus* et *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725. ANDER et coll. (1985) ont noté que *Phanerochaete chrysosporium* hydroxyle divers phénols ainsi que des dérivés du vératrole. Nos résultats confirment ces capacités hydroxylantes puisque les deux souches que nous avons étudiées transforment la benzophénone en ses dérivés méta- et para-hydroxylés.

Dans le 5ème groupe, à l'inverse du précédent, sont rassemblés les champignons pour lesquels la nature des produits de transformation de la benzophénone n'évolue pas au cours du temps. *Irpex lacteus* forme le composé dont le Rf est égal à 0,66 mais n'hydroxyle pas la benzophénone en position 3 ou 4. Ce résultat est à rapprocher de celui de KOHMOTO et coll. (1970) qui n'obtenaient pas d'hydroxylation de l'acide phénylacétique. Nous obtenons le même produit avec *Polyporus* sp. mais une faible quantité de 3 hydroxybenzophénone est détectée en 48 heures uniquement.

Dans ce groupe, le résultat le plus marquant est

fourni par les trois souches de *Naematoloma fasciculare*. Toutes les trois produisent le composé dont le Rf est égal à 0,66 mais nous avons en plus de la 3 et de la 4 hydroxy-benzophénones avec la souche 1, de la 44' dihydroxy-benzophénone avec la souche 2 et des benzophénones pluri-hydroxylées avec la souche 3. Pour chacune de ces souches le résultat est le même de 1 à 4 jours (ou 7 jours).

Nous avons vu qu'avec une autre espèce de *Naematoloma*, *N. capnoïdes*, différents produits apparaissent en fonction du temps. L'absence d'évolution dans la nature des produits formés au cours du temps avec *N. fasciculare*, laisse supposer que c'est une caractéristique de l'espèce. Pour valider une telle hypothèse, il faudrait tester un nombre important de *N. fasciculare* ainsi que d'autres espèces de *Naematoloma* afin de comparer les types de réponses.

Enfin dans le 6ème groupe, nous avons classé les souches qui présentent une phase de latence importante avant de transformer la benzophénone. Avec les deux souches appartenant à ce groupe, le composé dont le Rf est égal à 0,66 apparaît en 4 jours. La 3 hydroxybenzophénone apparaît dans le même temps avec *Inonitus tamaritis* tandis qu'elle n'est visible qu'au 7ème jour avec *Polyporus arcularius*.

Nous constatons que la nature des produits formés varie d'une espèce à l'autre, et même pour une espèce donnée. Aucune similitude de réponse ne semblant se dégager, un "screening" systématique est donc la seule méthode valable pour réaliser un inventaire des possibilités des différentes souches.

En conclusion, parmi les différentes souches testées, les plus intéressantes sont *Naematoloma fasciculare* 1 pour la constance dans les dérivés formés, *Stropharia rugoso annulata* qui donne en plus des benzophénones plurihydroxylées, *Poria vaillantii* et *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 pour lesquels les produits ne sont pas dégradés en 9 jours et *Poria*

viridens qui hydroxyle le substrat en 44' dihydroxybenzophénone dès 48 heures de contact. Les taches correspondant aux 3, 4 et 44' dihydroxybenzophénones sont comparativement plus intenses avec ces 5 souches qu'avec les autres. Néanmoins, cette intensité reste assez faible, ce qui révèle une réaction limitée.

3 - RECHERCHE DE SOUCHES O-DEMETHYLANT LA 44' DIMETHOXY-BENZOPHENONE

Après l'hydroxylation directe, la O-déméthylation représente une deuxième voie d'obtention des composés hydroxylés. Nous avons donc réalisé un "screening" de souches avec la 44' diméthoxybenzophénone afin d'établir les possibilités de mise en oeuvre d'une telle réaction.

3-1 : Présentation des souches

Comme pour les essais avec la benzophénone, les souches utilisées sont soit des Basidiomycotins - ordre des Agaricales et des Polyporales - soit des Zygomycotins soit des Deutéromycotins. La liste des souches testées est énoncée dans le tableau II-2. Certaines souches mises en contact avec la benzophénone ont été essayées avec ce 2ème substrat, notamment les 5 souches les plus intéressantes citées dans le paragraphe précédent.

Tableau II-2 : Souches testées avec la 44' diméthoxybenzophénone.

Basidiomycotins	Agaricales	Maematoloma fasciculare 1 Stropharia rugoso annulata Panaeolus sphinctrinus Maucaria rhombospora Conocybe subovalis Agaricus bisporus
	Polyporales	Phanerochaete chrysosporium Phanerochaete chrysosporium ATCC 24725 Poria viridens Poria vaillantii Polyporus arcularius Polyporus obtusus 2
Deutéromycotins	Hyphales	Trichoderma viride Aspergillus niger 1 Aspergillus niger 2 Alternaria sp. Botrytis cinerea
Zygomycotins	Mucorales	Rhizopus delemar

3-2 : Résultats et discussion

Les résultats sont donnés en figure II-2.

La présence des deux groupements méthoxyles, en orientant vers des réactions de O-déméthylation, limite la diversité des composés formés. Nous observons majoritairement la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et la 44' dihydroxybenzophénone. Toutefois, deux autres constituants dont les Rf sont égaux à 0,5 et 0,25 sont aussi parfois relevés. Certains des champignons testés étant capables d'hydroxyler des composés méthoxylés, ces deux constituants pourraient résulter d'une hydroxylation directe en même temps que d'une O-déméthylation du substrat.

Le 1er de ces constituants est moins polaire que la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone puisqu'il migre plus haut : il pourrait s'agir de la 44' diméthoxybenzophénone hydroxylée en position 3. Le 2ème est plus polaire que la 4 hydroxy-

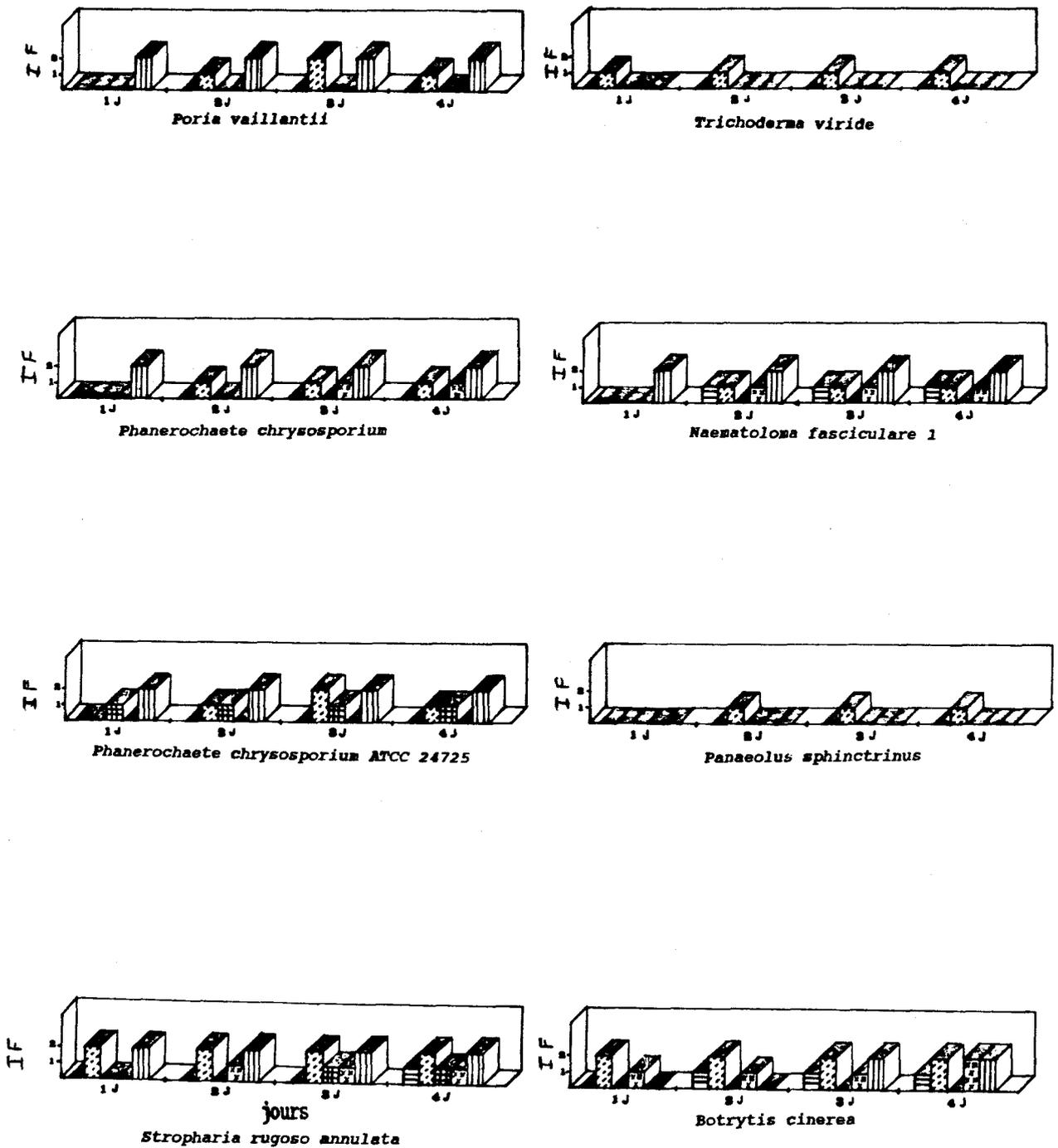


Figure II-2 : Bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone avec diverses souches de champignon.

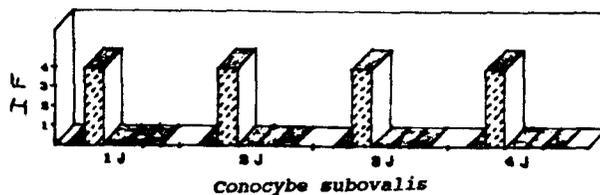
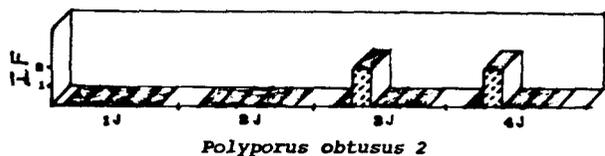
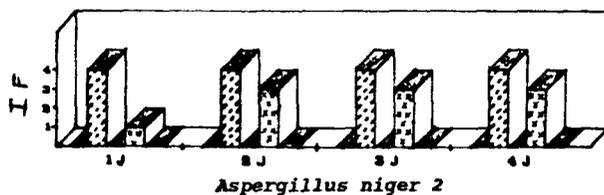
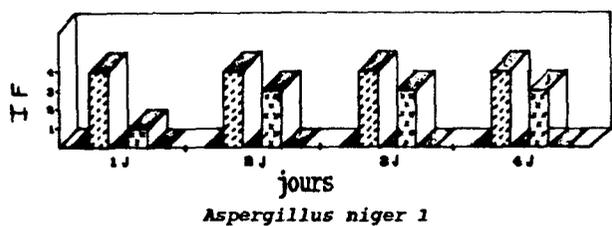
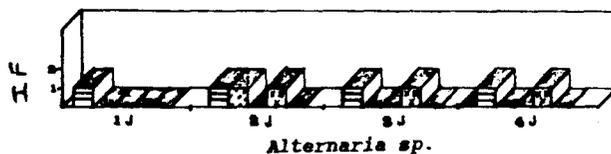
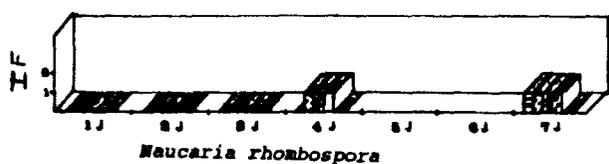


Figure II-2 : Bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone avec diverses souches de champignon.

Estimation à partir de CCN.  produit dont le Rf = 0,5,  4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone,  produit dont le Rf = 0,25,  44' dihydroxybenzophénone,  produit dont le Rf ≤ 0,19.
Quantités de produits : 1 = faible, 2 = moyenne, 3 = forte, 4 = très forte.

4' méthoxybenzophénone et moins polaire que la 44' dihydroxybenzophénone : il pourrait correspondre à la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone hydroxylée en position 2 ou 3.

Comme pour la benzophénone, la transformation de la 44' diméthoxybenzophénone n'est assurée que par certaines souches. La O-déméthylation de ce substrat n'est pas une caractéristique d'un genre donné : en effet *Poria vaillantii* transforme ce substrat alors que *Poria viridens* n'en est pas capable. TROJANOWSKI et HÜTTERMANN (1987) parlaient aussi d'une "faible capacité O-déméthylante" à propos de *Poria subacida*. De la même manière, *Polyporus obtusus* mono-O-déméthyle ce substrat tandis que *Polyporus arcularius* ne le transforme pas.

Nous remarquons que les deux souches d'*Aspergillus niger* testées, qui sont répertoriées sous deux numéros de collection différents, répondent de façon strictement identique. SMITH et ROSAZZA (1974) ont montré qu'*Aspergillus niger* pouvait O-déméthyle d'autres substrats comme l'anisole.

Nous constatons que *Poria viridens*, *Polyporus arcularius*, *Agaricus bisporus* et *Rhizopus delemar* n'effectuent pas la bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone. Avec d'autres espèces de *Rhizopus*, BOLLAG et LIU (1972) ainsi que SMITH et ROSAZZA (1974) ont obtenu l'hydroxylation du noyau naphthyle ou la O-déméthylation de l'anisole.

Certaines souches ne peuvent pas réaliser la 2ème réaction de O-déméthylation comme *Poria vaillantii*, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Trichoderma viride*, *Conocybe subovalis*, *Polyporus obtusus* 2 et *Panaeolus sphinctrinus*. La réaction est incomplète ; pour l'expliquer plusieurs hypothèses sont envisageables :

- les souches transforment difficilement ce substrat, ce qui implique que seule la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone soit visible. Ce peut être le cas de *Panaeolus sphinctrinus* et *Trichoderma viride* pour lesquels la

quantité de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone reste faible.

- la réaction n'a pas été poursuivie suffisamment longtemps. Par exemple pour *Polyporus obtusus* 2, le produit intermédiaire n'apparaît qu'au 3ème jour. Si la réaction avait été prolongée au delà du 4ème jour, nous aurions peut-être eu formation de 44' dihydroxybenzophénone.

- Certains champignons sont plus sensibles à l'action du produit de mono-O-déméthylation qui, à l'instar des dérivés monohydroxylés, serait plus toxique que le produit dihydroxylé.

- Le système enzymatique de certaines souches n'est pas capable de conduire la réaction à son terme.

Il est aussi intéressant de remarquer que *Phanerochaete chrysosporium* forme une petite quantité de 44' dihydroxybenzophénone alors que *Ph. chrysosporium* ATCC 24725 n'en est pas capable. Les nombreuses études sur cette espèce ont montré que l'aptitude à O-démétyler varie grandement en fonction des substrats testés (ANDER et coll., 1985 ; HAARS et coll., 1986).

Botrytis cinerea est cité dans la littérature comme espèce hydroxylante (KOHMOTO et coll., 1970) et O-déméthylante (MARBACH et coll., 1983 ; HAARS et coll. 1986). La souche dont nous disposons transforme assez bien la 44' diméthoxybenzophénone puisque nous avons des quantités moyennes de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et de 44' dihydroxybenzophénone.

De toutes les souches testées, les deux *Aspergillus niger* ainsi que *Conocybe subovalis* fournissent les réponses les plus marquantes. Pour ces trois souches, la très forte intensité des taches de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone dès le 1er jour de contact nous autorise à penser que le substrat est aisément transformé. Si *C. subovalis* s'arrête à ce stade de la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, les deux souches d'*A. niger* poursuivent la réaction jusqu'au stade de la 44' dihydroxybenzophénone. La forte intensité des taches de ce

44' diméthoxybenzophénone

benzophénone

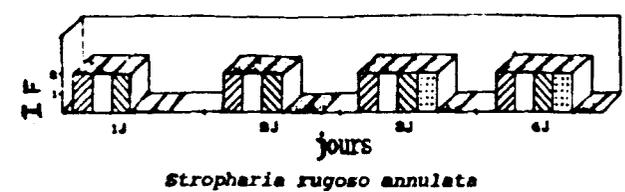
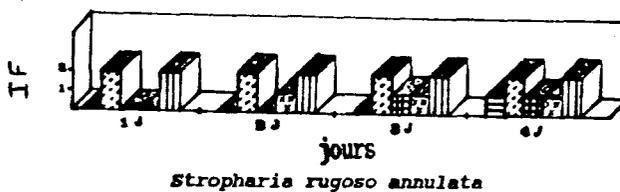
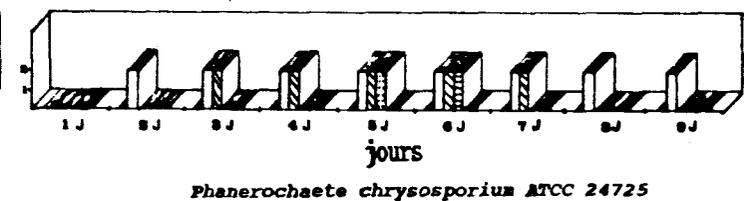
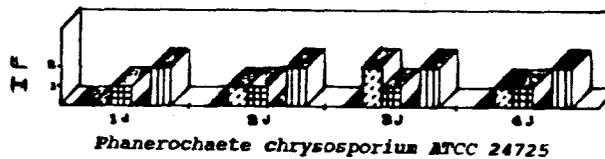
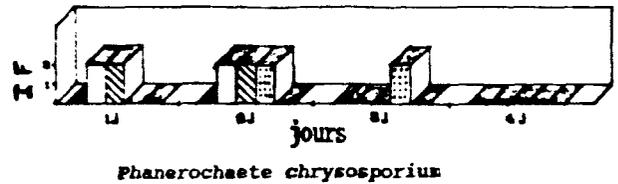
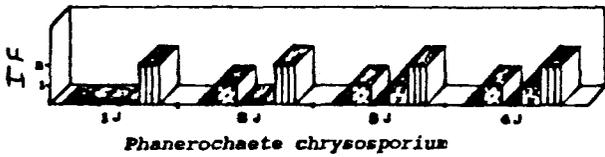
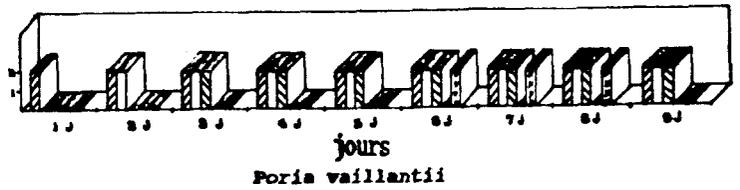
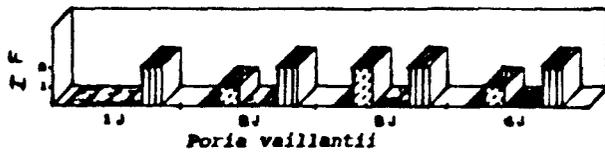


Figure II-3 : Bioconversion comparées de la benzophénone et de la 44' diméthoxybenzophénone.

Estimation à partir de CCM. produit dont le Rf = 0,66, 4 hydroxybenzophénone, 3 hydroxybenzophénone, 44' dihydroxybenzophénone, benzophénones pluri-hydroxylées, produit dont le Rf = 0,25, 44' dihydroxybenzophénone, produit dont le Rf = 0,5, = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, produit dont le Rf < 0,19. Quantités de produits : 1 = faible, 2 = moyenne, 3 = forte, 4 = très forte.

44' diméthoxybenzophénone

benzophénone

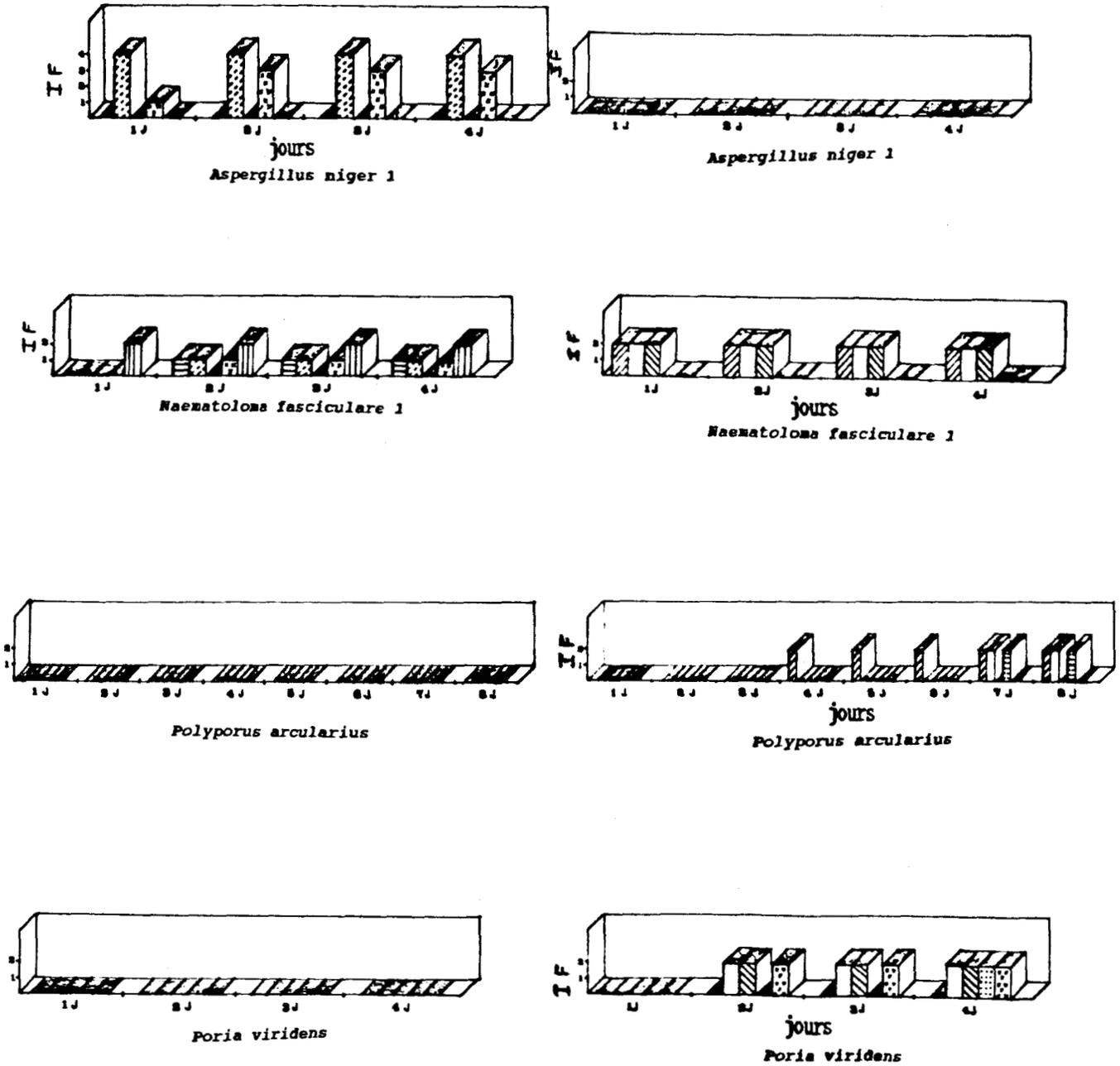


Figure II-3 : Bioconversion comparées de la benzophénone et de la 44' diméthoxybenzophénone.

Estimation à partir de CCM. produit dont le Rf = 0,66, 4 hydroxybenzophénone, 3 hydroxybenzophénone, 44' dihydroxybenzophénone, benzophénone pluri-hydroxylées, produit dont le Rf = 0,25, 44' dihydroxybenzophénone, produit dont le Rf = 0,5, 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, produit dont le Rf < 0,19. Quantités de produits : 1 = faible, 2 = moyenne, 3 = forte, 4 = très forte.

produit dès le 2ème jour, montre que la 2ème réaction de O-déméthylation est aussi aisément réalisée.

En outre , ces 3 souches ne forment aucun des autres produits répertoriés, comme par exemple ceux dont les Rf sont égaux à 0,5 et 0,25 et que nous supposons être des dérivés hydroxylés en position 2 ou 3 de la 44' diméthoxy-benzophénone. L'intensité et la rapidité d'apparition des produits ainsi que la spécificité de la réaction font ressortir l'intérêt évident de ces trois souches.

4 - CHOIX DU SUBSTRAT ET DE LA SOUCHE

Huit souches ont été testées à la fois avec la benzophénone et la 44' diméthoxybenzophénone, il s'agit de :

- *Phanerochaete chrysosporium*
- *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725
- *Naematoloma fasciculare* 1
- *Polyporus arcularius*
- *Poria viridens*
- *Poria vaillantii*
- *Stropharia rugosa annulata*
- *Aspergillus niger* 1

Les résultats ont été repris dans la figure II-3. Nous constatons que la transformation d'un substrat n'implique pas la transformation de l'autre. *Poria viridens* hydroxyle la benzophénone mais ne parvient pas à O-démétyler la 44' diméthoxybenzophénone. Pour *Aspergillus niger* les résultats sont inversés : seule la 44' diméthoxybenzophénone est transformée.

Avec *Polyporus arcularius*, la O-déméthylation de la 44' diméthoxybenzophénone n'est pas obtenue en 4 jours mais nous voyons que la transformation de la benzophénone a été très longue à démarrer. La poursuite de l'étude sur la

44' diméthoxybenzophénone au delà de 4 jours, aurait peut-être révélée une transformation de ce substrat. Toutefois dans cette hypothèse, la souche ne serait pas retenue à cause d'un temps de latence trop important, l'étude n'a donc pas été poursuivie.

Les 5 souches qui avaient attiré notre attention lors du "screening" avec la benzophénone ont été testées avec la 44' diméthoxybenzophénone. Pour quatre d'entre elles, nous constatons l'apparition de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone en plus ou moins grande quantité.

Stropharia rugosa annulata est celle qui produit le plus de cet intermédiaire de façon constante. De plus, une petite quantité de 44' dihydroxybenzophénone est obtenue.

Phanerochaete chrysosporium ATCC 24725 et *Poria vaillantii* présentent un pic de production le 3ème jour de contact avec le substrat, mais ne forment pas de 44' dihydroxybenzophénone.

Naematoloma fasciculare ainsi que *Phanerochaete chrysosporium* produisent à la fois peu de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et de 44' dihydroxybenzophénone.

Avec la benzophénone nous avons remarqué que la nature des dérivés n'évoluait pas au cours du temps chez *Naematoloma fasciculare*. Or il semble en être de même avec la 44' diméthoxybenzophénone. Ce résultat semble étayer l'hypothèse qu'une des caractéristiques de l'espèce serait de former les mêmes produits du début à la fin de l'expérience. Toutefois, nous constatons que globalement les produits formés évoluent moins au cours du temps avec la 44' diméthoxybenzophénone qu'avec la benzophénone. En outre, la présence du groupement méthoxyle oriente la réaction vers une O-déméthylation, ce qui limite le nombre de produits.

Lors de la répétition de certains essais, nous avons noté que la reproductibilité est beaucoup plus grande

avec la 44' diméthoxybenzophénone qu'avec la benzophénone. Avec cette dernière, nous avons remarqué que les mêmes produits apparaissent mais avec parfois un décalage dans le temps.

Enfin, l'hydroxylation de la benzophénone est beaucoup moins efficace que la O-déméthylation de la 44' diméthoxybenzophénone : les taches des produits d'hydroxylation de la benzophénone ont des intensités bien moindres que celles des produits de O-déalkylation de la 44' diméthoxybenzophénone.

En conclusion, la nature différente des réactions et les résultats non corrélés d'un substrat à l'autre, prouvent que les complexes enzymatiques mis en jeu sont totalement ou en partie indépendants. Ces diverses remarques nous ont poussés à choisir la 44' diméthoxybenzophénone comme substance modèle pour l'obtention de molécules aromatiques hydroxylées en position 4.

Avec ce substrat, les résultats les plus complets ont été obtenus avec *Aspergillus niger*. Cette souche montre une tache correspondant à la 44' dihydroxybenzophénone de forte intensité dès le 2ème jour de contact avec le substrat. *Conocybe subovalis*, l'autre espèce fongique intéressante, ne forme pas ce produit. *Aspergillus niger* est donc la seule souche testée capable de réaliser la réaction de double O-déméthylation avec intensité et rapidité.

De plus, les profils migratoires obtenus lors de différents essais n'ont pas révélé d'autres produits de transformation de la 44' diméthoxybenzophénone. Nous constatons qu'*Aspergillus niger* n'hydroxyle pas la benzophénone, il n'y a donc pas de risque pour qu'il hydroxyle la 44' diméthoxybenzophénone en même temps qu'il la O-déméthyle. *Aspergillus niger* sera donc la souche retenue pour étudier plus en détail cette réaction et l'optimiser.

CHAPITRE III

MISE AU POINT DU DOSAGE QUANTITATIF

1 - INTRODUCTION

Pour le "screening", l'analyse qualitative a été effectuée par chromatographie sur couche mince. Par cette technique nous pouvons également faire des analyses quantitatives. Pour cela, il faut utiliser des couches minces haute performance (HPTLC) qui présentent une surface plus régulière, une épaisseur de couche optimale et une granulométrie plus fine que les couches minces classiques. Les résultats sont quantifiés par une lecture densitométrique comparée des profils migratoires des essais et des témoins de concentrations connues. Ne pouvant disposer d'un appareillage de ce type, nous avons envisagé d'effectuer ce dosage par spectrophotométrie UV et par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Cette dernière technique est largement utilisée dans les séparations de composés aromatiques portant des fonctions hydroxyles. A titre d'exemple, DODGE et coll. (1979) ainsi que GOLBECK et coll. (1983) ont séparé les dérivés

hydroxylés du biphényle. Avec la même méthode CERNIGLIA et GIBSON (1978 et 1979) ont étudié les produits de transformation du naphthalène et du benzo(a)pyrène.

Dans l'optique d'un dosage quantitatif, nous devons parfaitement maîtriser chaque niveau de la réaction étudiée. La reproductibilité d'une analyse dépend en grande partie de la qualité de ces contrôles. A partir des données bibliographiques, nous avons choisi une méthode d'ensemencement et une densité d'inoculum appropriées. Puis nous nous sommes intéressés au substrat. Pour être accessible au microorganisme, il doit être mis en solution dans le milieu : nous avons donc changé de cosolvant et fait varier sa concentration. Enfin, nous avons mis au point les conditions de dosage et démontré que la valeur du pH du milieu au moment de l'extraction influe sur les résultats.

2 - L'ENSEMENCEMENT

Plusieurs paramètres peuvent interférer avec la reproductibilité de la réaction biotechnologique. Le premier de ces facteurs est l'homogénéité de la culture obtenue si l'inoculum lui-même est homogène et si un comptage de spores est effectué.

La suspension de spores doit être homogène afin que chaque inoculum contienne une même densité de population. Ainsi dans chaque essai, les spores puis le mycélium seront mieux répartis au sein du milieu ce qui permettra une véritable compétition vis à vis des éléments nutritifs et améliorera la réaction. En outre, pour comparer les essais réalisés à partir de différentes suspensions de spores, les densités de population de celles-ci doivent être équivalentes. Pour cela, un comptage s'avère nécessaire.

La suspension de conidies préparée dans de l'eau distillée stérile n'est pas homogène : les conidies s'agrègent entre elles pour former des sortes de "paquets" conidiens. De

plus, le comptage sur cellule de Thoma est très difficile voire impossible du fait de la superposition des conidies dans les agrégats. Pour éviter ces problèmes et assurer l'homogénéité des suspensions de conidies, l'emploi de solution de tween jusqu'à 0,1% a été proposé (GOLBECK et coll., 1983 ; COLOMBIE-BONO, 1990). Nous avons opté pour une solution de tween 20 à 0,01% qui correspond à la plus faible concentration en détergent permettant une bonne dispersion des conidies dans la suspension.

Les valeurs d'inoculum habituellement relevées, varient de $5 \cdot 10^4$ spores/100 ml d'*Aspergillus toxicarius* (GOLBECK et coll., 1983) à $2 \cdot 10^7$ spores/100 ml de *Phanerochaete chrysosporium* (ASTHER et coll., 1988). *Phanerochaete chrysosporium* est aussi ensemencé à raison de $2 \cdot 10^6$ spores (ASTHER et coll., 1987) et $7 \cdot 10^6$ spores pour 100 ml (COLOMBIE-BONO, 1990). Enfin, lors d'une étude sur la production d'acide citrique par une souche d'*Aspergillus niger*, TAKAHASHI et coll. (1965) avaient inoculé 100 ml de milieu avec 10^7 spores.

La densité de l'inoculum influence la taille des "pellets", nous nous sommes fixés un diamètre moyen de 3 à 5 mm. Une concentration de 10^7 spores pour 100 ml de milieu satisfait à cette exigence, ce qui nous a conduits à préparer une suspension de conidies à $2,5 \cdot 10^6$ spores/ml.

3 - CONCENTRATION EN SUBSTRAT

Dans les essais précédents, nous préparions une solution mère de 44' diméthoxybenzophénone à 10 g/l dans l'acétone que nous ajoutions au milieu de culture à raison de 2 ml pour 50 ml. La concentration finale du substrat était donc de 400 mg/l. Or, lors de l'addition de cette solution mère, il se produisait une opacification du milieu de culture et une partie de la 44' diméthoxybenzophénone flocculait.

Cette flocculation, sans grande incidence lors d'un

"screening", devenait gênante à partir du moment où nous voulions suivre quantitativement la bioconversion. En effet, dans ces conditions la concentration réelle du substrat n'est pas exactement connue et varie d'un essai à l'autre. Le substrat n'est donc pas disponible à tout moment "en continu" sous forme accessible au microorganisme.

Dans un premier temps, pour remédier à ce problème, nous avons recherché un cosolvant, autre que l'acétone, qui permette une meilleure solubilisation du substrat. Pour ce cosolvant, les limites fixées sont la solubilisation du substrat, la miscibilité à l'eau, la non toxicité vis-à-vis des champignons et l'absence d'effet sur la réaction enzymatique. Malgré de nombreuses tentatives, aucune cosolvant n'a évité cette floculation à cette concentration.

Nous avons donc décidé de diminuer la concentration de la solution mère jusqu'à ce que le milieu, après addition de celle-ci, soit optiquement clair. Nous sommes arrivés à une solution mère à 0,2 g/l soit une concentration de 8 mg/l dans le milieu réactionnel qui correspondra donc à la concentration initiale en substrat du point de vue de la réaction de bioconversion.

Pour éviter cette floculation, une addition, soit fractionnée, soit en continu, du substrat peut être envisagée. Toutefois, ces méthodes sont délicates à mettre en oeuvre dans nos conditions opératoires. Des additions de ce type sont plus faciles à organiser dans le cas de cultures en fermenteurs.

Tous les paramètres étant maintenant clairement établis, nous avons récapitulé dans l'annexe III-1 les techniques culturales et de bioconversion qui seront utilisées pour la suite de ces travaux.

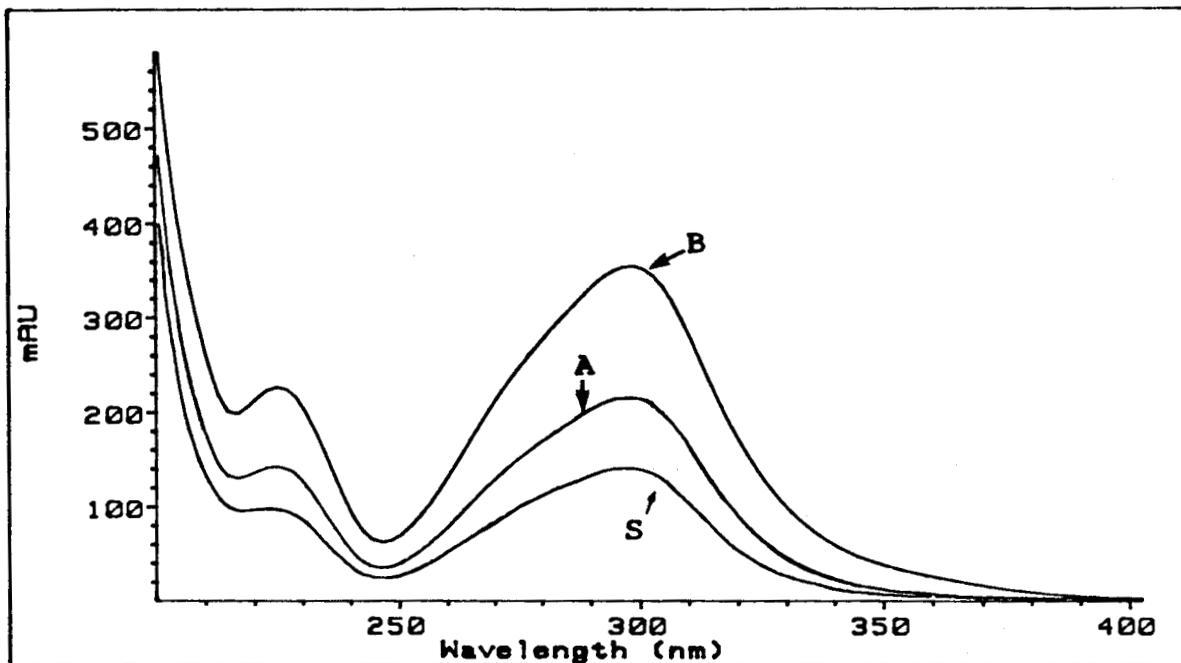


Figure III-1 : Spectres d'absorption de la 4,4' diméthoxybenzophénone et de ses produits de O-déméthylation.

S = 4,4' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 4,4' dihydroxybenzophénone.

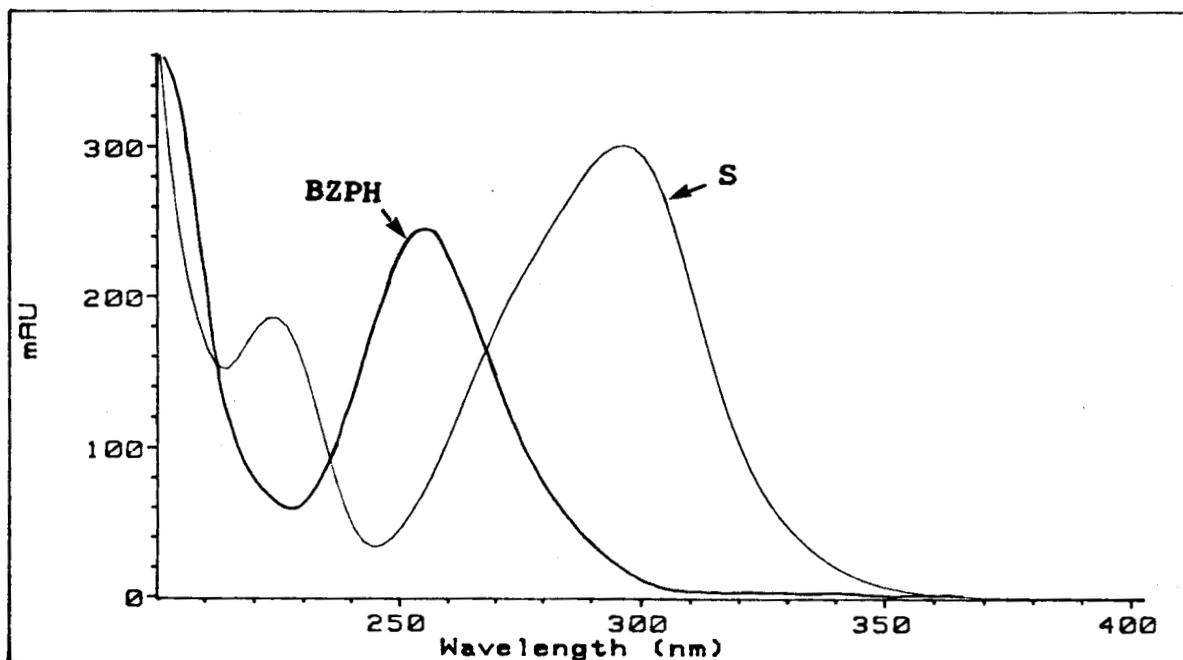


Figure III-2 : Spectres d'absorption de la benzophénone et de la 4,4' diméthoxybenzophénone.

BZPH = benzophénone, S = 4,4' diméthoxybenzophénone

4 - MISE AU POINT DU DOSAGE

Dans un premier temps nous avons tenté un dosage par spectrophotométrie UV. Pour ce faire, nous avons réalisé les spectres d'absorption de la 44' diméthoxybenzophénone et de ses deux dérivés O-déméthylés. Ces spectres ont été obtenus grâce à un spectrophotomètre double faisceau, ils ont été reportés sur la figure III-1. Nous constatons qu'ils sont en tous points superposables. La longueur d'onde d'absorption maximale se situe à 300 nm. Il n'est donc pas possible d'utiliser cette technique pour quantifier la réaction.

Nous nous sommes tournés vers la HPLC. Cette technique d'analyse nous permettra, après extraction, de suivre en même temps l'apparition des divers produits et la disparition du substrat.

4-1 : L'étalon interne

L'emploi d'un étalon interne (EI) améliore grandement la précision des résultats.

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que la concentration initiale en substrat est de 8 mg/l, les valeurs des différents produits à doser seront donc comprises entre 0 et 8 mg/l. L'étalon interne sera ajouté pour obtenir une concentration intermédiaire de 4 mg/l, cette addition aura lieu avant l'extraction.

Nous avons choisi d'utiliser la benzophénone comme étalon interne puisque nous avons montré, au cours des essais préliminaires, qu'elle n'était pas transformée par *Aspergillus niger*. Elle présente un maximum d'absorption à 254 nm alors que celui de la 44' diméthoxybenzophénone et de ses produits de réaction est de 300 nm (Figure III-2). Pour effectuer ce dosage, la longueur d'onde optimale se situe donc à 275 nm.

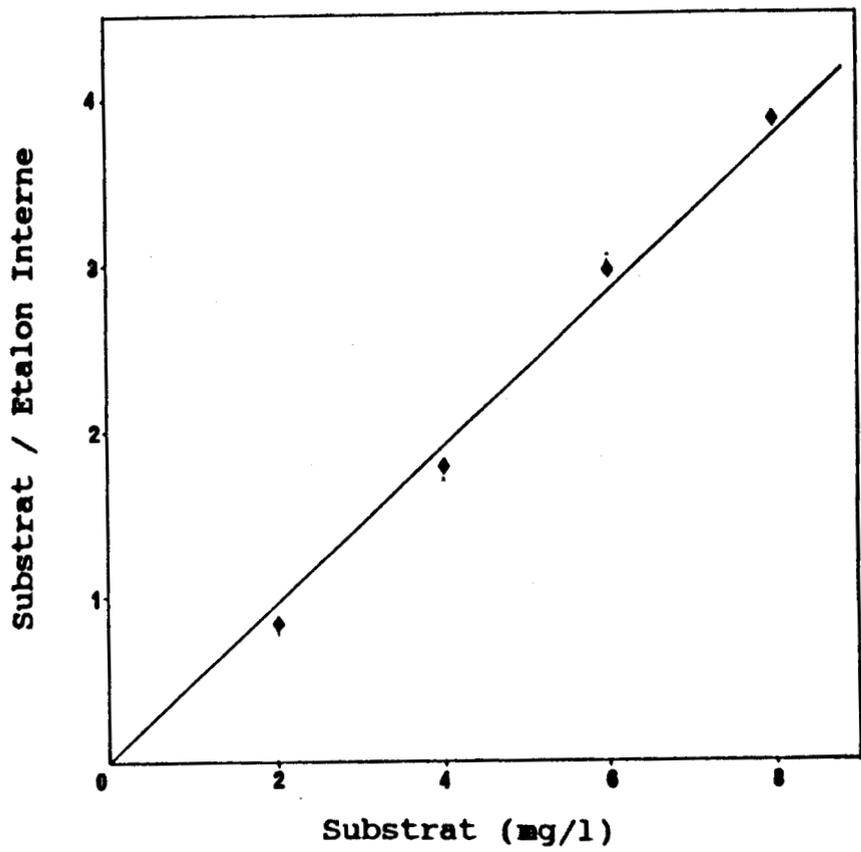


Figure III-3 : Rapports d'aires "substrat / Etalon Interne" en fonction des concentrations en substrat.

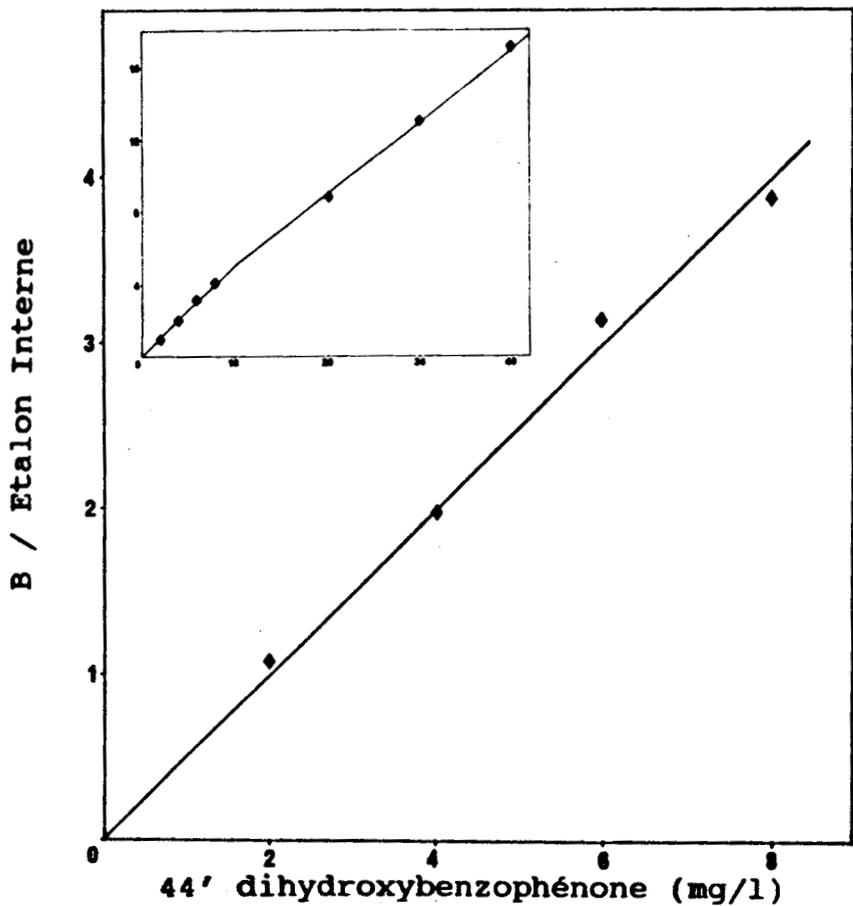


Figure III-4 : Rapports d'aires "44' dihydroxybenzophénone / Etalon Interne" en fonction des concentrations en 44' dihydroxybenzophénone (B).

4-2 : Courbes étalons

Elles ont été tracées pour la 44' diméthoxybenzophénone et la 44' dihydroxybenzophénone : ce sont les seuls produits disponibles dans le commerce. Une gamme de concentrations pour chacun de ces deux produits a été préparée dans l'acétone. Un volume fixe (2 ml) de chacune de ces solutions est ajouté à 48 ml de milieu de culture non ensemencé. Dans le tableau III-1, nous donnons les correspondances entre les concentrations des solutions mères préparées dans l'acétone et les concentrations finales des échantillons. Les trois dernières solutions (0,5 - 0,75 et 1 g/l) n'ont été préparées qu'avec la 44' dihydroxybenzophénone.

Tableau III-1 : Gamme d'étalonnage.

Concentrations des solutions mères (g/l)	0,05	0,10	0,15	0,20	0,50	0,75	1
Concentrations finales (mg/l)	2	4	6	8	20	30	40

Les conditions d'extraction et d'analyse sont décrites en annexe III-2. Chaque échantillon de la gamme d'étalonnage est injecté 3 fois.

Les droites d'étalonnage sont représentées sur les figures III-3 et III-4.

Les rapports d'aires "substrat / EI" sont directement proportionnels aux concentrations de 44' diméthoxybenzophénone quand celles-ci sont comprises entre 0 et 8 mg/l. La concentration en substrat (C_S) est calculée à partir des rapports d'aires "substrat / EI" (R_S) grâce à la relation :

$$C_S = 2 R_S / 0,95$$

En ce qui concerne la 44' dihydroxybenzophénone (B), le rapport d'aires "B / EI" varie de façon linéaire pour des concentrations de 0 à 8 mg/l. Pour connaître la concentration du produit dihydroxylé (C_B) il suffit de multiplier les rapports d'aires "B / EI" (R_B) par 2 :

$$C_B = 2 R_B$$

Pour des concentrations plus importantes, jusqu'à 40 mg/l, la courbe s'infléchit légèrement.

La 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone (A) a été identifiée par spectrométrie de masse (Figure I-6) mais n'existe pas dans le commerce. Il ne nous a donc pas été possible d'établir une courbe d'étalonnage pour ce produit. Néanmoins, la similitude de réponse entre le substrat et la 44' dihydroxybenzophénone nous autorise à croire que la relation entre les rapports d'aires "A / EI" (R_A) et les concentrations en ce produit (C_A) sera linéaire. Nous nous servons d'une formule moyenne :

$$C_A = 2 R_A / 0,975$$

4-3 : Influence du pH du milieu sur l'extraction

Les produits de la bioconversion comportent des fonctions phénol, ils sont donc plus solubles dans l'eau que le substrat.

De plus dans un milieu polaire comme le milieu de culture, si le pH est basique la forme $Ar-O^-$ sera privilégiée. Or sous cette forme les produits seront encore moins soluble dans un solvant organique que sous la forme $Ar-OH$. En acidifiant le milieu en fin de réaction, nous devrions plus facilement extraire les produits formés.

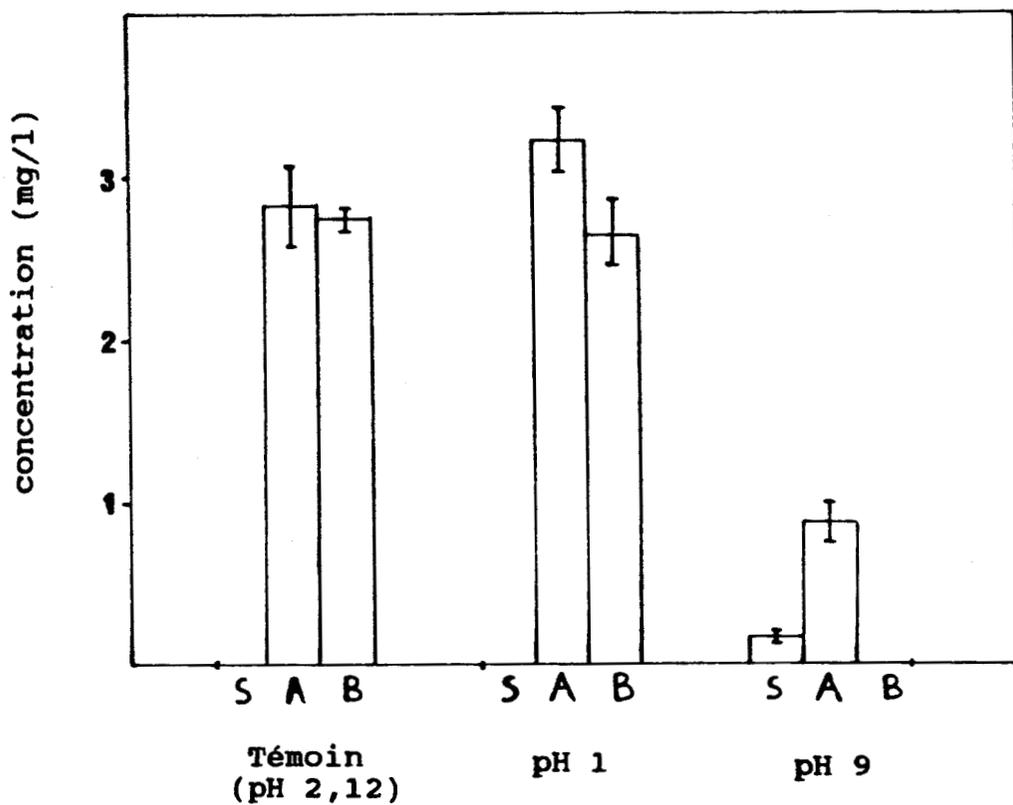


Figure III-5 : Effet du pH du milieu sur l'extraction.
 Détermination par HPLC. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone,
 B = 44' dihydroxybenzophénone.

Pour cette étude nous avons mis en oeuvre le protocole de l'annexe III-1 à la souche d'*Aspergillus niger*. Mais après la filtration sous vide, le filtrat de chacune des 3 fioles a été divisé en 3 parties égales. Comme indiqué dans l'annexe pré-citée, les premières parties sont acidifiées jusqu'à pH 1 par HCl 6N ("pH 1"). Le pH des deuxièmes parties est amené à pH 9 par NaOH 6N ("pH 9"). Les troisièmes parties sont laissées en l'état ("Témoin") : la valeur moyenne de pH est de $2,12 \pm 0,02$.

Les conditions d'extraction et d'analyse en HPLC sont celles décrites en annexe III-2.

Les concentrations en 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et 44' dihydroxybenzophénone obtenues dans les "Témoins" et les essais "pH 1" sont en tous points comparables (Figure III-5). La différence constatée pour le produit intermédiaire n'est pas significative au vu des écarts-types.

Par contre pour les essais dont le pH a été porté à 9, le dérivé dihydroxylé n'est pas obtenu et seulement un peu plus du quart du produit mono-O-déméthylé est retrouvé. Dans le même temps, une petite quantité de substrat (moins de 2% de la valeur initiale), qui n'apparaissait pas dans les 2 précédentes séries, est obtenue.

Ces résultats confirment notre hypothèse. A pH alcalin, les ions OH^- arrachent les hydrogènes des fonctions hydroxylées. Les composés aromatiques ionisés (Ar-O^-) sont plus solubles dans le milieu de culture que dans le solvant d'extraction. Une partie du composé intermédiaire est néanmoins extraite car il reste une fonction méthoxyle sur la molécule elle est donc plus hydrophobe que la 44' dihydroxybenzophénone. La similitude de réponses entre les essais "pH 1" et les "Témoins" s'explique par la forte diminution du pH au cours de la culture. Le pH relevé (2,12) est suffisamment acide pour privilégier la forme acide des produits de bioconversion.

En conclusion, le pH du filtrat de culture au

moment de l'extraction s'avère être un élément essentiel pour une analyse quantitative fiable et reproductible. Il sera donc important de contrôler le pH et d'acidifier le milieu si nécessaire.

DEUXIEME PARTIE

FACTEURS INFLUENCANT LA REACTION DE O-DEMETHYLATION
DE LA 44' DIMETHOXYBENZOPHENONE
PAR ASPERGILLUS NIGER

Les chapitres précédents ont permis de sélectionner un substrat, la 44' diméthoxybenzophénone et un microorganisme, *Aspergillus niger*. L'étude des facteurs agissant sur la bioconversion se divise en quatre chapitres :

Chapitre IV : Paramètres généraux de la réaction

Chapitre V : Influence des facteurs nutritifs

Chapitre VI : Influence de l'environnement physico-chimique

Chapitre VII : Influence de la concentration des acteurs de la bioconversion

CHAPITRE IV

PARAMETRES GENERAUX DE LA REACTION

1 - INTRODUCTION

Aspergillus niger est classé parmi les champignons imparfaits (Deutéromycotins), classe des Hyphomycètes, ordre des Hyphales. Aucune forme parfaite n'est connue pour cette espèce, même s'il en existe pour de nombreux autres *Aspergillus* qui sont alors appelés *Eurotium*.

L'ouvrage de RAPER et FENNELL (1965) fait une synthèse des différents domaines dans lesquels diverses souches d'*Aspergillus niger* interviennent : la production d'acides organiques, d'antibiotiques ou de pigments, l'excrétion d'enzymes, l'évaluation de l'activité fongicide de certaines molécules, le dosage des éléments minéraux du sol, la biosynthèse et la bioconversion de molécules biologiques. Bien qu'il soit la plupart du temps saprophyte, certaines études citées par ces mêmes auteurs signalent aussi le caractère phytopathogène de ce champignon.

La principale application industrielle

d'*Aspergillus niger* est la production d'acide citrique. L'utilisation de cellules immobilisées sur différents supports améliore le rendement (EIKMEIER et REHM, 1984 ; VAIJA et LINKO, 1986 ; LEE et coll., 1989). Des polyols comme le glycérol, l'érythritol ou l'arabitol peuvent être synthétisés en quantités variables en fonction des concentrations en saccharose utilisées (HONECKER et coll., 1989).

Parallèlement à l'acide citrique, la production des acides lactique et itaconique a également été observée (HORITSU et coll., 1988).

Une grande diversité d'enzymes est produite par *Aspergillus niger*. Nous pouvons citer les enzymes pectinolytiques (MAREK et coll., 1988 ; FRIEDRICH et coll., 1989 ; MALDONADO et coll., 1989 ; LEUCHTENBERGER et coll., 1990) et cellulolytiques (KUYUMDJIEVA et coll., 1987 ; GOLDMAN et coll., 1988) mais aussi les glucoamylases et α -amylases (LI et coll., 1984 ; CHEN, 1988).

L'amélioration de la production de glucose-oxydase fait aussi l'objet de recherches importantes (MARKWELL et coll., 1989) puisqu'une des formes commercialisées de cet enzyme est issue d'*Aspergillus niger*.

Ce champignon est aussi connu pour sa capacité à produire des lipases (HUGUES et coll., 1988), et la souche utilisée au cours de notre étude s'est révélée être productrice de lipases spécifiques d'un acide gras saturé à courte chaîne, l'acide laurique (de LABORDE de MONPEZAT, 1990).

Dans le domaine des bioconversions, de nombreux substrats sont hydroxylés ou O-déméthylés par *Aspergillus niger*. L'acide benzoïque est sélectivement hydroxylé en position 4 (REDDY et VAIDYANATHAN, 1975 ; VAN BALKEN et coll., 1987) ainsi que l'acide m-hydroxybenzoïque (KUMAR et coll., 1978), tandis que l'acide phénoxyacétique et l'anisole sont transformés en leurs dérivés ortho-hydroxylés (BOCKS et coll.,

1964 ; BOCKS, 1967). Ces auteurs ainsi que SMITH et ROSAZZA (1974), ont également constaté la formation de phénol à partir de l'anisole. D'autres acides organiques sont hydroxylés : l'acide phénylacétique en position 2 (FAULKNER et WOODCOCK, 1968 ; SUGUMARAN et VAIDYANATHAN, 1979), l'acide 3-indole acétique (KOSHCHENKO et coll., 1977), ou l'acide grindélique (HOFFMANN et coll., 1988).

Les acides carboxyliques ne sont pas les seuls dérivés transformés par *Aspergillus niger*. Par exemple, SAHASRABUDHE et coll. (1986) ont montré que ce champignon utilise l'orcinol (3,5-dihydroxytoluène), et DMOCHWITZ et BALLSCHMITER (1988) ont fait la preuve de la biodégradation de polychloro-biphényles (PCB). *Aspergillus niger* est également utilisé pour produire des protéines en dépolluant des déchets comme l'eau de pressage des olives (HAMDI et coll., 1991).

Enfin, au cours de recherches portant sur la biodégradation des lignines, la O-déalkylation de molécules modèles est observée par différentes espèces d'*Aspergillus* dont *Aspergillus niger* (MILSTEIN et coll., 1984).

Dans ce chapitre, nous avons déterminé les caractéristiques principales de la réaction.

2 - ADDITION DU SUBSTRAT A DIFFERENTS STADES DE LA CROISSANCE

Nous voulons déterminer à quel stade de la croissance le substrat doit être ajouté pour obtenir la meilleure bioconversion possible.

La souche d'*Aspergillus niger* a été mise en culture suivant les conditions énoncées en annexe III-1 mais la concentration en glucose est de 2 g/l. La réaction n'a pas été suivie par HPLC mais par chromatographie sur couche mince comme lors du "screening". Cette méthode ne nous permet pas d'obtenir des résultats chiffrés, mais elle est suffisamment sensible

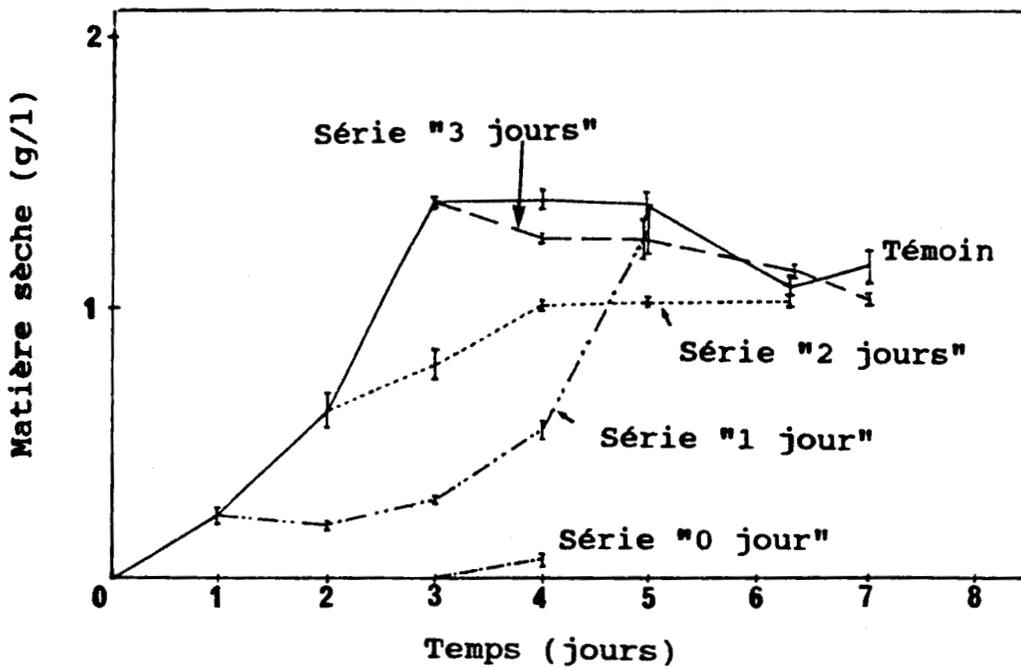


Figure IV-1 : Influence sur l'évolution de la matière sèche du moment de l'addition du substrat.

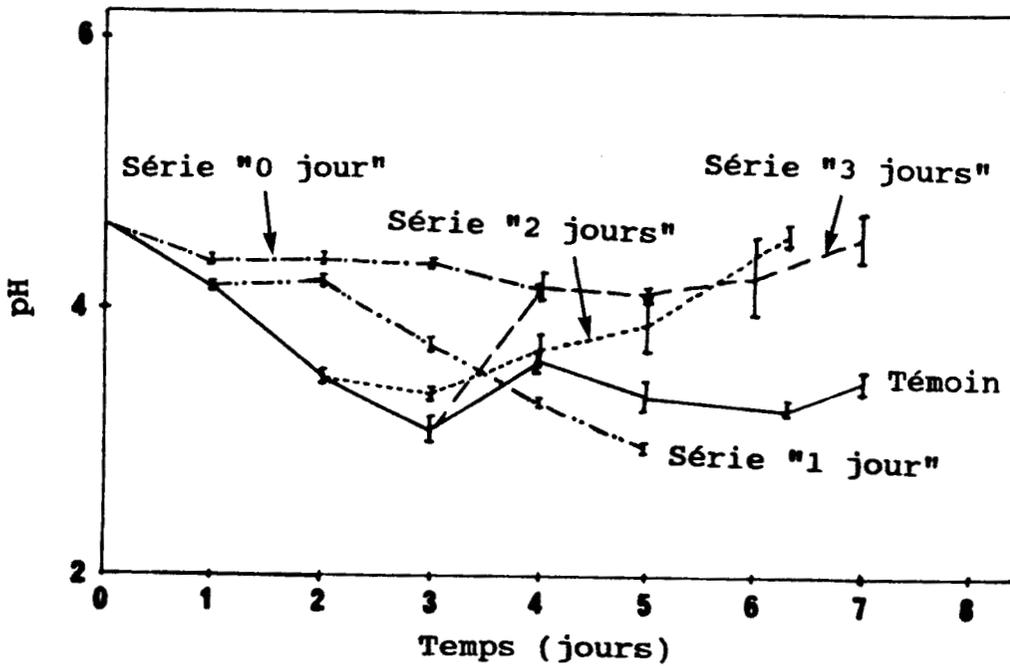


Figure IV-2 : Influence sur l'évolution du pH du moment de l'addition du substrat.

pour apprécier directement les quantités de produits formés. Les conditions d'extraction et d'analyse sont détaillées en annexe IV-2.

L'addition du substrat a lieu à différents moments de la croissance du champignon : soit au moment de l'ensemencement soit un jour après l'ensemencement, et ainsi de suite, de jour en jour jusqu'à 7 jours après l'inoculation du milieu de culture. Pour chacun de ces essais, la transformation du substrat est suivie pendant 4 jours.

2-1 : Courbes de croissance

Nous avons suivi l'évolution de la croissance mycélienne par mesure de la matière sèche cellulaire (Annexe IV-1) et vérifié le pH des filtrats de culture. L'évolution de ces deux paramètres est illustrée par les figures IV-1 et IV-2.

La courbe de croissance enregistrée sans addition de substrat (appelée "Témoin") présente un début de phase stationnaire dès le 3ème jour de culture. A partir du 5ème jour, la matière sèche diminue préfigurant la phase de déclin. Parallèlement, le pH décroît durant la phase exponentielle de croissance puis se stabilise.

La 44' diméthoxybenzophénone ajoutée au moment de l'ensemencement (série "0 jour"), empêche la germination normale des conidies d'*Aspergillus niger* : seul un léger développement est perceptible au 4ème jour de contact. Comme aucune croissance n'a lieu le pH reste à sa valeur de départ.

Lorsque le substrat est ajouté un jour après l'ensemencement (série "1 jour"), la croissance du champignon est stoppée pendant 24 heures. Elle repart d'abord lentement puis assez nettement deux ou trois jours plus tard. La courbe de pH révèle exactement les mêmes étapes : stabilisation, puis reprise de la diminution du pH. Nous n'obtenons pas la phase

Tableau IV-1 : Evolution de la bioconversion en fonction du moment d'addition du substrat.

S ajouté à des cultures âgées de	Temps de contact	24 h	48 h	72 h	96 h
0 jour		0	0	0	(±) A
1 jour		A	A (±) B	A (±) B	A (±) B
2 jours		(+) A B	(++) A (++) B	(++) A (++) B	(++) A (++) B
3 jours		(+) A (+) B	(++) A (++) B	(++) A (++) B	(++) A (++) B
4 jours		A B	(+) A (+) B	(+) A (+) B	(+) A (+) B
5 jours		A B	A B	(+) A (+) B	(+) A (+) B
6 jours		A	A (±) B	A B	A B
7 jours		A	A (±) B	A (±) B	A B

Estimation à partir de OCH. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Quantité de S, A ou B : (±) = faible, (+) = forte, (++) = très forte, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée comme moyenne.

stationnaire, mais les valeurs de matière sèche et de pH au 5ème jour de culture étant identiques à celles du témoin, nous pouvons supposer que la fin de la phase exponentielle de croissance est atteinte.

L'addition de 44' diméthoxybenzophénone 2 jours après le démarrage de la culture (série "2 jours") ralentit la croissance mais ne la stoppe pas comme dans le cas précédent. Toutefois la quantité de biomasse finale est plus faible que dans le témoin : la culture ne "rattrape" pas son niveau "normal". La phase stationnaire est obtenue le 4ème jour de culture c'est-à-dire avec 24 heures de retard par rapport au témoin. Après avoir suivi la même évolution que le témoin, le pH remonte progressivement à sa valeur d'origine.

Dès que la culture atteint la phase stationnaire, l'addition de substrat n'a plus d'influence sur l'évolution de la croissance du champignon (série "3 jours"). Lorsque le substrat est ajouté au 3ème ou au 4ème jour de culture, le pH remonte légèrement 24 heures après cette addition. Aucun effet n'est observable lorsque l'addition a lieu au delà du 4ème jour.

2-2 : Bioconversion

Les résultats sont récapitulés dans le tableau IV-1. Le moment de l'addition du substrat est un paramètre non négligeable de la bioconversion. L'analyse des résultats nous conduit à définir trois types de réponses :

- Dans le 1er, un ou les deux produits ont des difficultés à apparaître : dans l'essai où l'addition du substrat et l'ensemencement sont concomitants, une faible quantité de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone apparaît seulement après 96 heures de contact. Lorsque l'addition de la 44' diméthoxybenzophénone a lieu 24 heures après l'ensemencement, la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone est

correctement représentée mais le rendement en 44' dihydroxybenzophénone est faible.

- Le 2ème type regroupe les essais pour lesquels les valeurs relatives des produits sont fortes ou très fortes. Un décalage de 2 ou 3 jours entre l'inoculation et l'addition du substrat aboutit à de très fortes proportions des deux dérivés O-déméthylés. Par contre si la culture est un peu plus âgée au moment de l'addition de la 44' diméthoxybenzophénone (4 ou 5 jours) la réaction de bioconversion est un peu moins performante.

- Enfin si l'addition du substrat n'a lieu qu'après 6 ou 7 jours de croissance, la réaction de O-déméthylation s'essoufle. En effet en 24 heures, il se forme une quantité moyenne de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone mais la 44' dihydroxybenzophénone demande plus de temps pour atteindre ce même niveau.

2-3 : Conclusion

La 44' diméthoxybenzophénone retarde fortement la germination des spores et perturbe la croissance mycélienne puisque nous observons un très net ralentissement de celle-ci avant que le champignon ne s'adapte à cette nouvelle contrainte.

La mise en oeuvre des conidies n'est pas un phénomène marginal. En effet VEZINA et SINGH (1975) répertorient de nombreuses réactions réalisées par des spores fongiques telles que la formation de cétones ou les transformations de stéroïdes, d'antibiotiques, d'hydrates de carbone... TSAY et TO (1986) ont également utilisé des conidies d'*Aspergillus niger* immobilisées pour produire de l'acide citrique. Dans notre cas, aucun produit de O-déméthylation ne se forme en l'absence de croissance : la forme mycélienne est donc indispensable à ce type de réaction.

Le moment le plus propice à l'addition de la

44' diméthoxybenzophénone se situe entre le deuxième et le cinquième jours de croissance c'est-à-dire du milieu de la phase exponentielle jusqu'à la fin de la phase stationnaire. En effet durant cette période les quantités de produits formées sont les plus importantes. Un résultat similaire a été obtenu avec une autre espèce d'*Aspergillus*, *A. toxicarius*, par GOLBECK et COX (1984). Ils ont ajouté leur substrat, le biphényle, 24 heures, 48 heures ou 72 heures après l'ensemencement et ont constaté que la vitesse initiale d'hydroxylation est la meilleure lorsque le biphényle est ajouté après 24 heures de croissance c'est-à-dire à la fin de la phase exponentielle. Une addition plus tardive - durant la phase stationnaire - entraîne une diminution de la vitesse d'hydroxylation.

3 - ETUDES SUR LE FILTRAT DE CULTURE

Une telle étude a pour but de mettre en évidence une éventuelle excrétion d'enzymes dans le milieu de culture soit en essayant de transformer le substrat par des filtrats de culture, soit en dosant des activités enzymatiques extracellulaires.

3-1 : Essais de O-déméthylation

Si les enzymes intervenant dans cette réaction sont excrétés, les filtrats de culture devraient logiquement assurer la transformation de la 44' diméthoxybenzophénone. Deux séries d'expériences ont été conduites en parallèle : la 1ère destinée à la recherche d'enzymes constitutifs, la deuxième plus adaptée aux cas d'enzymes induits (Annexe IV-2).

Dans cette 2ème série, nous avons ajouté le substrat de la réaction en très faible quantité dès le début de la croissance pour qu'il agisse comme un inducteur. Celui-ci, bien qu'étant insoluble dans un milieu aqueux, a été ajouté aux milieux de culture directement sous forme cristallisée.

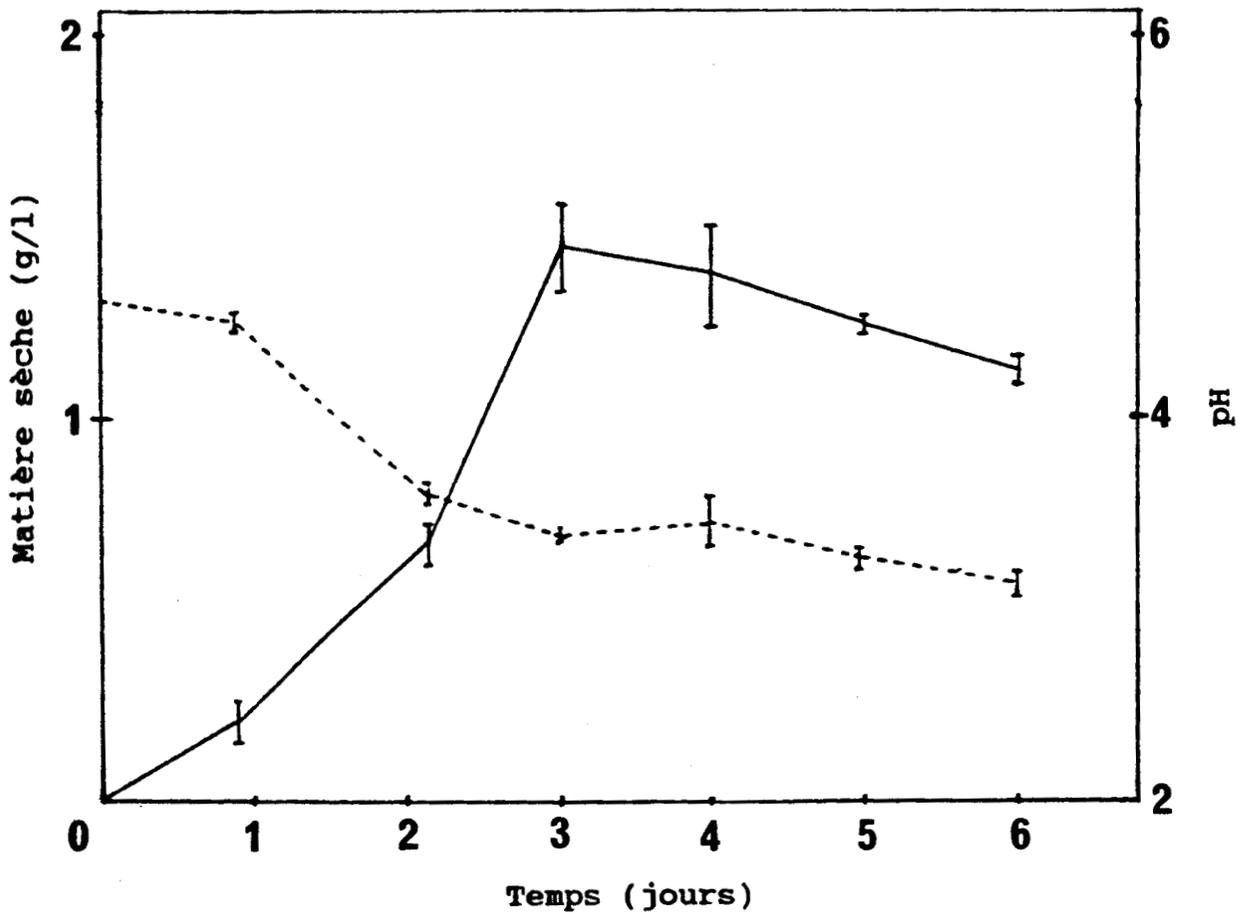


Figure IV-3 : Effets respectifs sur la croissance d'Aspergillus niger et sur l'évolution du pH du milieu de culture de l'addition de substrat cristallisé au moment de l'ensemencement.

— : Matière sèche - - - - : pH

L'insolubilité d'un composé n'est jamais stricte, nous avons supposé qu'une infime partie pourrait se solubiliser et suffirait à provoquer un phénomène d'induction.

Pour prouver un tel fait, nous avons réalisé des "Témoins-Champignons" : ce sont des fioles d'Erlenmeyer qui sont ensemencées puis filtrées stérilement comme les essais mais dont les filtrats ne reçoivent pas de substrat. Toutes les 24 heures comme pour les essais, 3 de ces filtrats sont extraits et analysés par CCM. Lors de la filtration stérile, nous avons constaté que les cristaux de 44' diméthoxybenzophénone étaient retenus par le filtre en même temps que le mycélium. Or l'analyse de ces filtrats a révélé dans tous les cas une tache chromatographique, faiblement visible, correspondant à la 44' diméthoxybenzophénone. C'est donc la preuve qu'une petite quantité de substrat s'est dissoute et a pu jouer le rôle d'inducteur.

Nous avons aussi voulu étudier les effets de cette addition de substrat cristallisé sur la croissance d'*Aspergillus niger* et le pH du milieu de culture (Figure IV-3). Si nous comparons ces courbes à celles du témoin dans les figures IV-1 et IV-2, aucune différence notable n'est observée : la présence de faibles quantités de 44' diméthoxybenzophénone cristallisée n'influe pas sur le développement d'*Aspergillus niger*.

Aucune de ces deux expériences n'a abouti à la transformation de 44' diméthoxybenzophénone malgré un suivi de 72 heures pour la première série et de 96 heures pour la série avec inducteur.

Le ou les enzymes responsables de cette réaction de O-déméthylation ne sont probablement pas des enzymes extracellulaires ou bien ils ne sont pas présents sous forme active.

3-2 : Recherche d'activités enzymatiques particulières

Des enzymes impliqués dans la biodégradation des lignines sont capables de O-déméthyliser certains composés comme les méthoxybenzènes pour la lignine-péroxydase (TIEN, 1987) et les méthoxyphénols pour la laccase (ISHIHARA, 1980).

Nous avons cherché à savoir si la réaction de O-déméthylation réalisée par notre souche d'*Aspergillus niger* ne résulte pas des activités lignine-péroxydase ou laccase. Les protocoles expérimentaux sont détaillés dans l'annexe IV-3.

Ces mesures ont été effectuées à différentes reprises mais aucune de ces deux activités n'a été détectée.

Nous en concluons que, dans nos conditions de milieu et de culture, *Aspergillus niger* n'excrète ni laccase, ni lignine-péroxydase.

CHAPITRE V

INFLUENCE DES FACTEURS NUTRITIFS

1 - INTRODUCTION

Dans le précédent chapitre nous avons montré l'existence d'un lien étroit entre la croissance mycélienne et le rythme de la bioconversion. Or pour obtenir une croissance optimale, le milieu de culture doit satisfaire aux exigences nutritionnelles du champignon. Le carbone étant le constituant majoritaire du squelette cellulaire, la source carbonée est l'un des éléments essentiels du milieu. Par ailleurs, la nature de cette source de carbone a des répercussions sur la production des métabolites (MARTIN et DEMAIN, 1978), la germination des conidies (ABDEL-RAHIM et ARBAB, 1985) ou la production enzymatique (METWALLY et coll., 1991). Par exemple dans une culture d'*Aspergillus niger*, le glycérol favorise l'accumulation du citrate par inhibition de l'isocitrate-deshydrogénase (LEGISA et KIDRIC, 1989). Ce même alcool (ASTHER et coll., 1987) ainsi que les celluloses ou les lignocelluloses (LEISOLA et coll., 1985) stimulent la production de lignine-peroxydases chez *Phanerochaete chrysosporium*. Toujours dans ce domaine de la biodégradation des lignines, l'adjonction de

saccharose à un milieu à l'extrait de malt améliore notablement la production de laccase de *Polyporus hirsutus* (AMIN et coll., 1985).

Parallèlement à la source carbonée, les oligoéléments exercent une influence sur la nutrition et l'élaboration de produits ou d'enzymes. Les ouvrages de HAWKER (1950), LILLY et BARNETT (1951), SMITH et BERRY (1975) ou SMITH et PATEMAN (1977) rapportent les travaux de nombreux auteurs prouvant que le zinc, le fer, le cuivre ou le manganèse sont indispensables à la croissance d'une grande majorité de champignons. Ces mêmes ouvrages relèvent un effet largement positif du zinc, du fer et du cuivre sur la synthèse des acides citrique ou itaconique chez *Aspergillus niger*. Cette espèce est également très tolérante vis à vis de la concentration en cuivre : HASHEM (1989) a montré qu'elle survivait jusqu'à 0,5 mg/ml de cuivre. En outre certains enzymes hétéroprotéiques utilisent des cofacteurs parmi lesquels nous retrouvons des ions métalliques comme Zn^{2+} , Cu^{2+} ou Fe^{2+} .

2 - LA SOURCE CARBONÉE

2-1 : Source carbonée faiblement métabolisable

Dans les premiers essais le carbone était fourni sous forme de glucose. Or celui-ci est connu pour être un répresseur métabolique. ARST et BAILEY (1977) rapportent de nombreux travaux qui leur ont permis d'établir une liste des principaux enzymes réprimés par le glucose chez *Aspergillus nidulans*. Nous avons remplacé le glucose par 2 autres substrats carbonés et les différents résultats sont analysés. Enfin, l'effet de la concentration en glucose dans le milieu a été étudié.

Les conditions de culture sont présentées en annexe III-1, les analyses sont réalisées par CCM (Annexe IV-2).

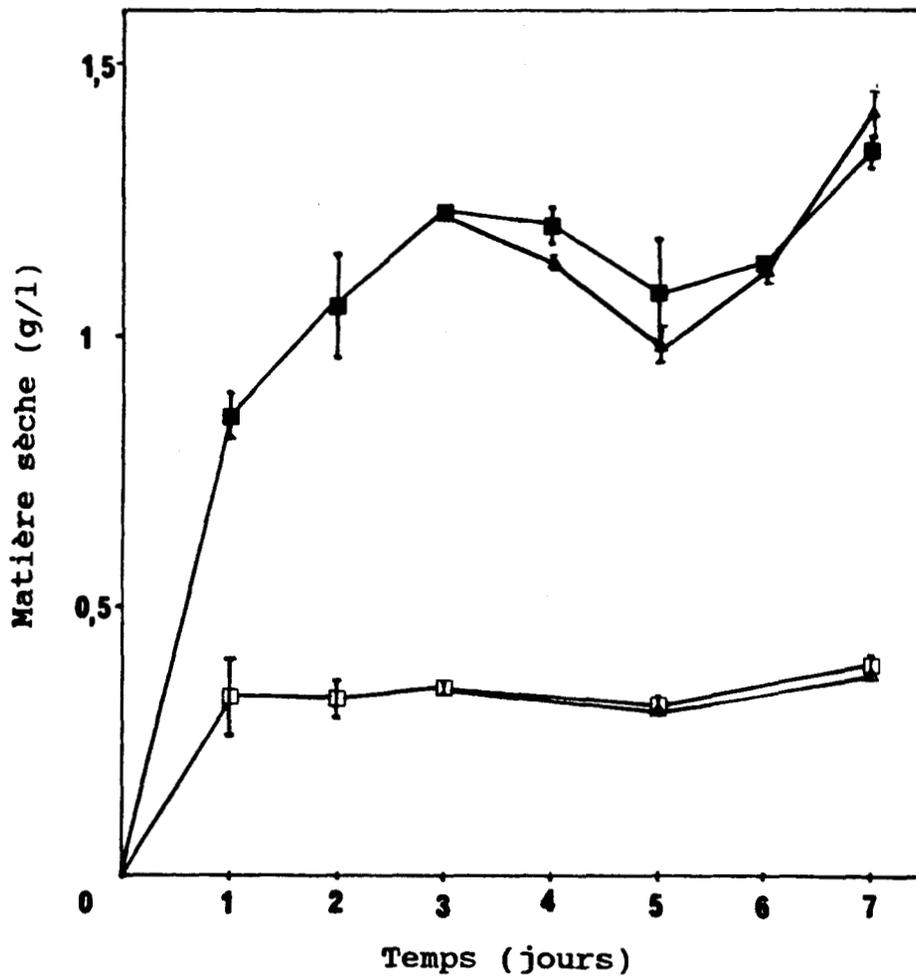


Figure V-1 : Influence de la concentration en lactate sur la croissance d'*Aspergillus niger*.

0,8 g/l de carbone : □-□ = sans addition de substrat, △-△ = après addition de substrat ; 8 g/l de carbone : ■-■ = sans addition de substrat, ▲-▲ = après addition de substrat.

2-1-1 : Le lactate

Pour éviter un éventuel effet répresseur du glucose, nous avons cherché à le remplacer par d'autres sources carbonées sans effet répresseur et moins métabolisables. Dans l'ouvrage de LILLY et BARNETT (1951), STEINBERG a montré qu'*Aspergillus niger* métabolise modérément le lactate : nous avons choisi de tester cette source carbonée.

Le glucose, initialement à une concentration de 2 g/l, apporte une quantité de carbone égale à 0,8 g/l. Une concentration en carbone identique a été fournie avec du lactate, puis une 2ème expérience a été conduite avec 8 g/l de carbone afin d'améliorer les résultats.

2-1-1-1 : La croissance

Avec 0,8 g/l de carbone, le rendement en biomasse est très faible : environ 0,35 g/l (Figure V-1). Dans le chapitre précédent avec une même concentration en carbone (Figure IV-1), la quantité de matière sèche atteint 1,4 g/l soit 4 fois plus. En outre dès 24 heures, nous obtenons le maximum de croissance alors que 72 heures sont nécessaires avec le glucose. Le lactate n'est donc pas assimilé.

Pour parvenir à une biomasse sensiblement identique à celle qui est obtenue avec le glucose, la concentration en lactate doit être multipliée par 10. Dans cet essai la phase stationnaire commence au 3ème jour de croissance comme dans l'essai avec le glucose. Néanmoins la phase exponentielle n'a pas le même aspect : la vitesse, rapide pendant les premières 24 heures, diminue les deux jours suivants alors que le phénomène inverse s'accomplit avec le glucose.

Tableau V-1 : Influence de la concentration en lactate sur la bioconversion.

Concentration en carbone	Temps de contact	24 h	48 h	72 h	96 h
0,8 g/l		(++) S (±) A	(++) S (±) A	(+) S A	(+) S A
8 g/l		(++) S (±) A	(++) S (±) A	(+) S A (-) B	(+) S A (-) B

Estimation à partir de CCM. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Quantité de S, A ou B : (-) très faible, (±) = faible, (+) = forte, (++) = très forte, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée comme moyenne.

Avec nos 2 concentrations en lactate, nous n'observons pas le début de la phase d'autolyse comme avec le glucose : il y aurait même une légère reprise de la croissance au 7ème jour. En revanche, quelle que soit la source carbonée, l'addition de 44' diméthoxybenzophénone ne modifie pas la forme des courbes de croissance.

2-1-1-2 : La bioconversion

Avec la plus faible concentration en lactate, le substrat est transformé en 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et la 44' dihydroxybenzophénone apparaît, seulement en très légère quantité, avec 8 g/l de carbone (Tableau V-1). Dans la série d'expériences avec le glucose, les biomasses étaient différentes en raison d'une addition du substrat à différents moments de la croissance. Ici, l'addition se fait à des stades évolutifs équivalents (dans les premiers jours de la phase stationnaire), or la bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone est améliorée lorsque la biomasse est plus importante. Le taux de bioconversion n'est donc pas indépendant de la biomasse.

En outre à quantités de matière sèche semblables (1,4 g/l), la O-déméthylation est beaucoup plus efficace avec le glucose qu'avec le lactate. Avec celui-ci, il reste toujours une proportion assez forte de substrat même après 4 jours de réaction.

En conclusion le lactate est une source de carbone très peu satisfaisante pour la croissance d'*Aspergillus niger* et peu propice à la transformation du substrat : elle ne sera donc pas utilisée pour la suite de l'expérimentation.

2-1-2 : Le glycérol

Le glycérol est une source carbonée plus lentement

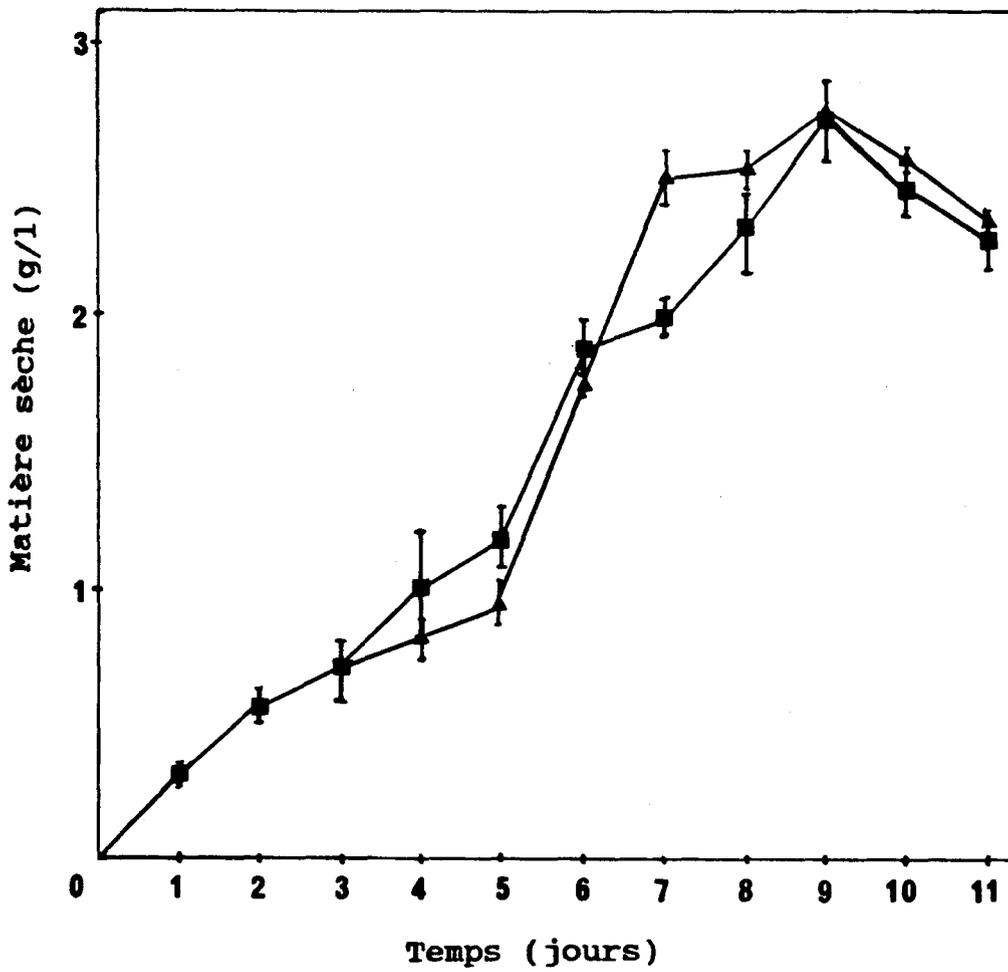


Figure V-2 : Evolution de la croissance d'*Aspergillus niger* avec le glycérol comme source carbonée.

■ = sans addition de substrat, ▲ = après addition de substrat.

métabolisable que le glucose et fréquemment utilisé dans les milieux destinés à la production d'enzymes catalysant la biodégradation des lignines. Des réactions de O-déméthylation intervenant lors de cette biodégradation, nous pensons favoriser ce type de réaction avec ce substrat carboné.

2-1-2-1 : La croissance

La concentration en glycérol fournit une concentration en carbone dans le milieu égale à 2 g/l. La cinétique de croissance est beaucoup plus lente qu'avec le glucose (Figure V-2) : la croissance est maximale au 9ème jour de culture avec une quantité de matière sèche de 2,7 g/l. Le glycérol est donc mieux assimilé que le lactate. L'addition de la 44' diméthoxybenzophénone survient après 3 jours de culture c'est à dire à la fin du premier tiers de cette phase exponentielle étalée dans le temps. Nous remarquons immédiatement que cette addition ne change en rien l'évolution de la croissance du champignon alors qu'avec le glucose des diminutions plus ou moins marquées du développement mycélien s'observent sans ambiguïté.

Nous pouvons envisager que le ralentissement de la croissance engendré par cette addition de substrat est masqué par la faiblesse de la vitesse de croissance. Les deux mesures faites après l'adjonction du substrat donnent des valeurs inférieures à celles du témoin mais les marges d'erreur se chevauchant, aucune conclusion n'est possible. Néanmoins ce pourrait être le seul signe de ces perturbations.

Nous remarquons également que la phase de déclin démarre immédiatement après le maximum de croissance alors qu'une phase stationnaire, plus ou moins longue, s'installe aussi bien avec le glucose qu'avec le lactate.

Tableau V-2 : Bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone avec du glycérol comme source carbonée.

Temps de contact	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Produits	S A (±) B	S B	(±) S (±) B	0	0	0	0

Estimation à partir de CCM. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Quantité de S, A ou B : (±) = faible, 0 = aucun produit, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée comme moyenne.

2-1-2-2 : La bioconversion

Le rendement de la bioconversion est meilleur qu'avec le lactate : dès 24 heures de contact il reste moins de substrat, la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone est plus représentée et la 44' dihydroxybenzophénone est synthétisée (Tableau V-2). Néanmoins, par rapport aux essais avec le glucose, les valeurs relatives des deux produits sont moindres, et une quantité non négligeable de substrat n'est toujours pas transformée en 48 heures. Il est surprenant de constater la disparition du substrat, après 48 heures de contact, sans apparition concomitante de ses dérivés O-déméthylés. Devant un tel résultat, deux solutions sont envisageables : soit le substrat est métabolisé, soit il pénètre ou se fixe sur la membrane ou la paroi du champignon et n'est donc plus visible dans le milieu de culture. Dans le 1er cas, le substrat serait utilisé comme simple source de carbone. Cette hypothèse semble peu probable. En effet, le substrat commence à disparaître au 6ème jour de culture alors que la phase exponentielle de croissance n'est pas terminée et qu'une source carbonée plus simple - le glycérol - est encore disponible. Même dans le cas d'une inhibition par le glycérol du système enzymatique intervenant dans cette O-déméthylation, il semble plus logique que le substrat reste dans le milieu sans être modifié, comme lorsque les souches ne transforment pas ce substrat. De plus il resterait encore à expliquer pourquoi *Aspergillus niger* métabolise la 44' diméthoxy-benzophénone alors qu'il l'a toujours O-déméthylée.

Dans la 2ème hypothèse, il faut supposer une action du glycérol sur les membranes. Un début d'explication pourrait être fourni par les travaux de COLOMBIÉ-BONO (1990) sur *Phanerochaete chrysosporium*. Cet auteur a montré que le taux d'insaturation des acides gras des phospholipides était plus élevé avec le glucose qu'avec le glycérol. Or plus une membrane plasmique contient des phospholipides à acides gras insaturés plus elle est fluide ; le substrat pourrait donc être

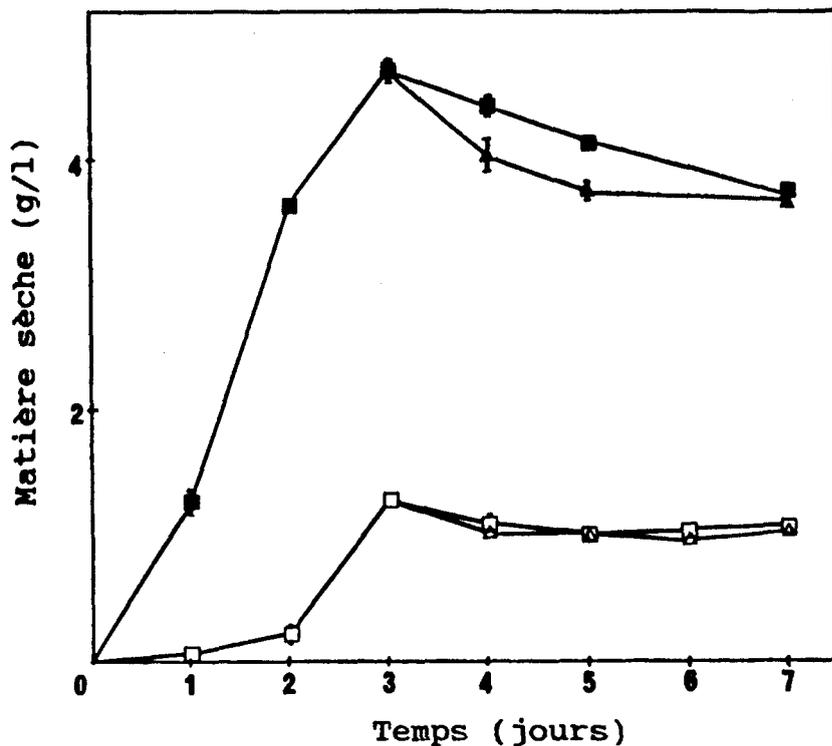


Figure V-3 : Influence de la concentration en glucose sur la croissance d'*A. niger*.

10 g/l de glucose : ■—■ = sans addition de substrat, ▲—▲ après addition de substrat ; 2 g/l de glucose : □—□ = sans addition de substrat, △—△ = après addition de substrat.

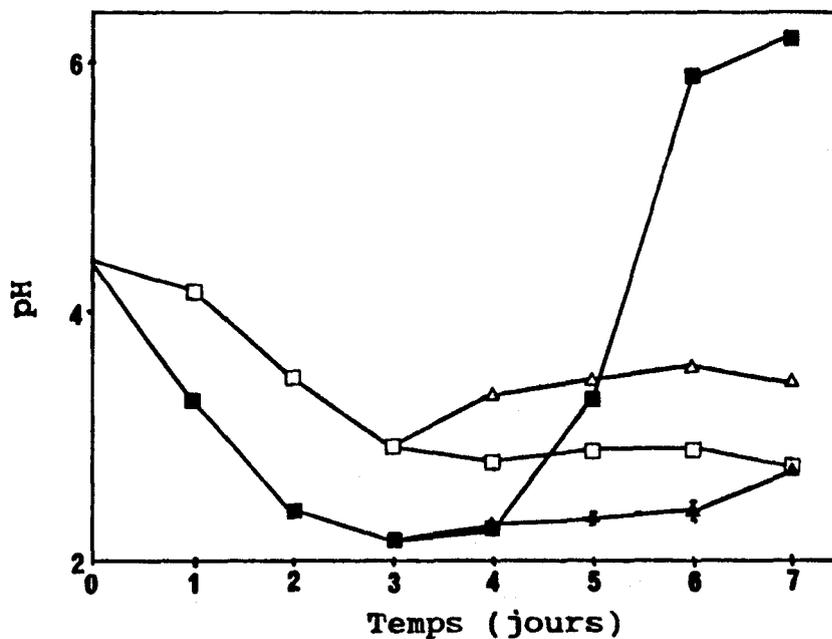


Figure V-4 : Influence de la concentration en glucose sur le pH d'une culture d'*A. niger*.

10 g/l de glucose : ■—■ = sans addition de substrat, ▲—▲ après addition de substrat ; 2 g/l de glucose : □—□ = sans addition de substrat, △—△ = après addition de substrat.

plus facilement absorbé. En outre, la nature des acides gras étant changée, la polarité membranaire peut être modifiée.

En conclusion l'utilisation de glycérol comme source carbonée n'apporte aucune amélioration à la bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone.

2-2 : Le glucose

2-2-1 : La concentration en glucose

Les rendements obtenus avec le lactate et le glycérol restent inférieurs à celui obtenu avec le glucose. Nous avons décidé de poursuivre les essais avec cette dernière source carbonée : deux concentrations en glucose ont été testées.

2-2-1-1 : La croissance

A 2 comme à 10 g/l, la biomasse maximale est recueillie après 3 jours de culture avec respectivement 1,3 g/l et 4,7 g/l de matière sèche (Figure V-3). Nous avons déjà constaté que l'addition du substrat au début de la phase stationnaire ne perturbe pas l'évolution ultérieure du développement mycélien : ce point est de nouveau vérifié.

Le pH (Figure V-4) varie en sens inverse de la croissance, c'est aussi un critère permettant de suivre le développement mycélien : plus la croissance augmente plus le pH diminue. Avec 10 g/l de glucose le pH descend pratiquement à 2 au 3ème jour de culture. Des acides organiques sont fréquemment synthétisés lors de l'utilisation de substrats carbonés simples comme le glucose (LILLY et BARNETT, 1951 ; COCHRANE, 1958). Les acides pyruvique succinique et citrique sont les plus couramment formés, or *Aspergillus niger* est une espèce qui produit naturellement ce dernier acide en grande

Tableau V-3 : Influence de la concentration en glucose sur la bioconversion.

Concentration en glucose	Temps de contact	24 h	48 h	72 h	96 h
2 g/l		S (+) A (±) B	S (+) A B	(±) S A B	A (+) B
10 g/l		(±) S (++) A B	(±) A (++) B	(++) B	(++) B

Estimation à partir de CCM. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Quantité de S, A ou B : (±) = faible, (+) = forte, (++) = très forte, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée comme moyenne.

quantité : il possède donc la capacité à s'adapter à une telle diminution de pH.

A partir du 4ème jour de culture, le pH commence à remonter pour atteindre la valeur de 6,2 au 7ème jour de culture. Ce phénomène peut s'expliquer par le relargage de composés azotés lors de l'autolyse de la culture. Toutefois cette augmentation du pH semble importante par rapport à la faible diminution de biomasse ; à 10 g/l de glucose l'acidité du milieu est telle que notre souche d'*Aspergillus niger* subit probablement des modifications physiologiques conduisant à un rééquilibrage du pH du milieu. Ainsi avec ce champignon WEBB, cité par HAWKER (1950), a constaté que pour des pH inférieurs à 2,8 des modifications cellulaires intervenaient. Les travaux de BÜNNING repris par LILLY et BARNETT (1951) ont également montré que pour des pH internes inférieurs à 4,2, les cellules d'*Aspergillus niger* s'altéraient.

Avec *Aspergillus toxicarius*, GOLBECK et COX (1984) ont hydroxylé du biphényle : le pH du milieu descend à 2,9 puis augmente pendant la bioconversion pour atteindre 5,9.

En revanche, en présence de 44' diméthoxybenzophénone le pH n'augmente que légèrement à l'instar de l'essai à 2 g/l de glucose.

2-2-1-2 : La bioconversion

Nous constatons qu'avec une biomasse plus importante la vitesse de transformation du substrat est améliorée (Tableau V-3). En 24 heures il ne reste pratiquement plus de 44' diméthoxybenzophénone et il se forme de la 44' dihydroxybenzophénone. En outre la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone disparaît rapidement pour laisser la place au composé dihydroxylé. Avec une concentration en glucose de 10 g/l la réaction de O-déméthylation est totale, il sera donc facile de suivre le rendement de la bioconversion. Une relation de proportionnalité entre la biomasse et la quantité

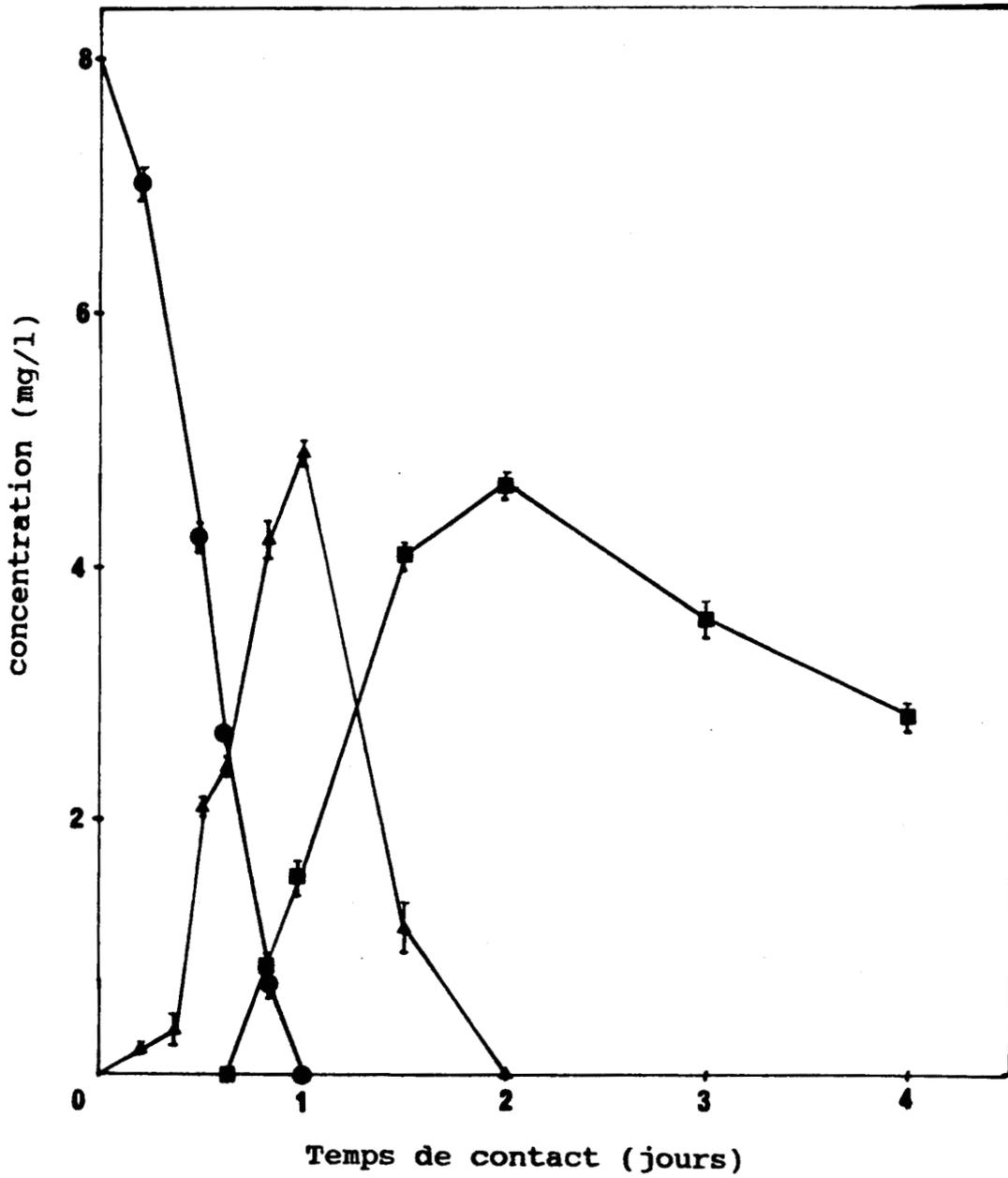


Figure V-5 : Cinétique de la bioconversion avec 10 g/l de glucose.

Détermination par HPLC. ●—● = 44' diméthoxybenzophénone, ▲—▲ 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, ■—■ 44' dihydroxybenzophénone.

de biphényle hydroxylé à également été mis en évidence par GOLBECK et COX (1984).

Les deux séries d'essais ont fait l'objet d'un dosage de la concentration de glucose par la glucose-oxydase (Annexe V). Dans les 2 cas la presque totalité du glucose est consommée au cours des trois premiers jours de croissance : au moment de l'addition du substrat il ne reste que 2 à 4% du glucose initial.

2-2-2 : La cinétique de la bioconversion

Les conditions expérimentales étant celles décrites en annexe III-1, nous avons mis en oeuvre une 2ème série d'essais en vue d'un dosage plus précis par HPLC (Annexe III-2)

La cinétique de la bioconversion est illustrée par la figure V-5. En 24 heures la 4' diméthoxybenzophénone a disparu du milieu et la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone est à son maximum. Le produit dihydroxylé n'apparaît que 20 heures après l'addition du substrat et culmine après 48 heures de contact.

Comme nous pouvons l'attendre d'une réaction séquentielle, le produit intermédiaire n'apparaît que de façon transitoire. GOLBECK et coll. (1983) ont obtenu exactement le même type de réponse au cours de leur étude sur l'hydroxylation du biphényle : le pic de production du 4 hydroxybiphényle est obtenu après 24 heures de contact avec le substrat, puis 24 heures plus tard, tandis que le composé intermédiaire a disparu, c'est au tour du composé dihydroxylé d'atteindre son maximum. Toutefois dans ce cas, les quantités de produit intermédiaire sont près de 10 fois inférieures à celles du 4' dihydroxybiphényle. Ces auteurs ayant montré que le dérivé monohydroxylé est toxique, la 2ème hydroxylation est quasi immédiate pour éviter une accumulation de ce produit.

Dans notre cas le composé mono-O-déméthylé est largement accumulé dans le milieu de culture puisque les quantités produites sont du même ordre de grandeur que celles du produit final. Notre composé intermédiaire doit donc être moins toxique que le 4 hydroxybiphényle.

Au delà de 48 heures de contact, la 44' dihydroxybenzophénone diminue : elle peut être métabolisée mais GOLBECK et coll. (1983) ont montré que le 44'dihydroxybiphényle se transforme en son ester d'acide sulfonique. Cet apparent déclin de la concentration en 44' dihydroxybenzophénone peut s'expliquer soit par l'apparition de tels composés, soit par la métabolisation du produit final.

En lère approche, la transformation du substrat en 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone semble se faire avec 35% de perte et la 2ème O-déméthylation semble totale. Ces taux de bioconversion, obtenus à partir des résultats bruts, doivent être corrigés. En réalité en 24 heures, il y a 21,5 $\mu\text{moles/l}$ (4,90 mg/l) de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et 7,1 $\mu\text{moles/l}$ (1,53 mg/l) de 44' dihydroxybenzophénone ; le total des produits formés est donc de 28,6 $\mu\text{moles/l}$, à comparer aux 33 $\mu\text{moles/l}$ (8 mg/l) de substrat au départ, ce qui correspond à un rendement apparent d'environ 87%. C'est un rendement par défaut car les produits sont uniquement dosés dans les filtrats de culture, en conséquence les quantités de produits fixées ou contenues dans les cellules ne sont pas comptabilisées.

Enfin si la totalité de la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone présente dans le milieu en 24 heures était O-déméthylée, nous devrions avoir 28,6 $\mu\text{moles/l}$ de 44' dihydroxybenzophénone, or la concentration maximale en 48 heures est de 21,6 $\mu\text{moles/l}$ (4,63 mg/l) : le rendement apparent de la 2ème O-déméthylation est donc de 75%. En conclusion, le rendement apparent global de la bioconversion se situe autour de 65% après 48 heures de contact avec le substrat.

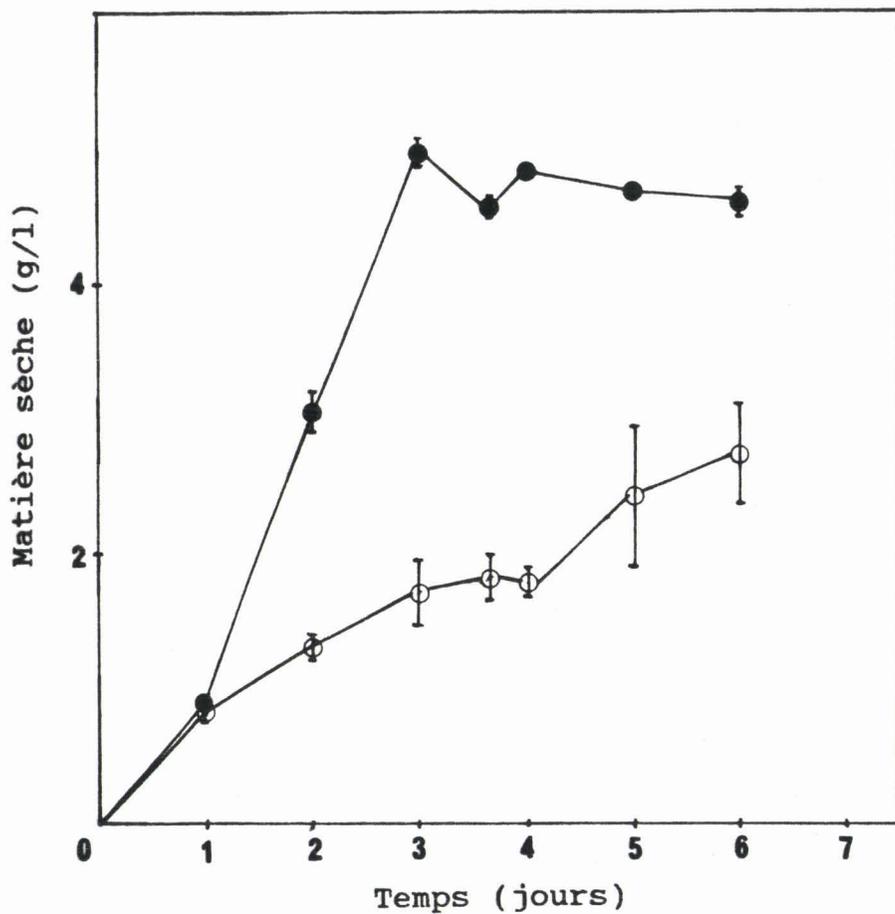


Figure V-6 : Influence des oligoéléments sur la croissance d'A. niger.

●● = avec oligoéléments, ○○ = sans oligoélément.

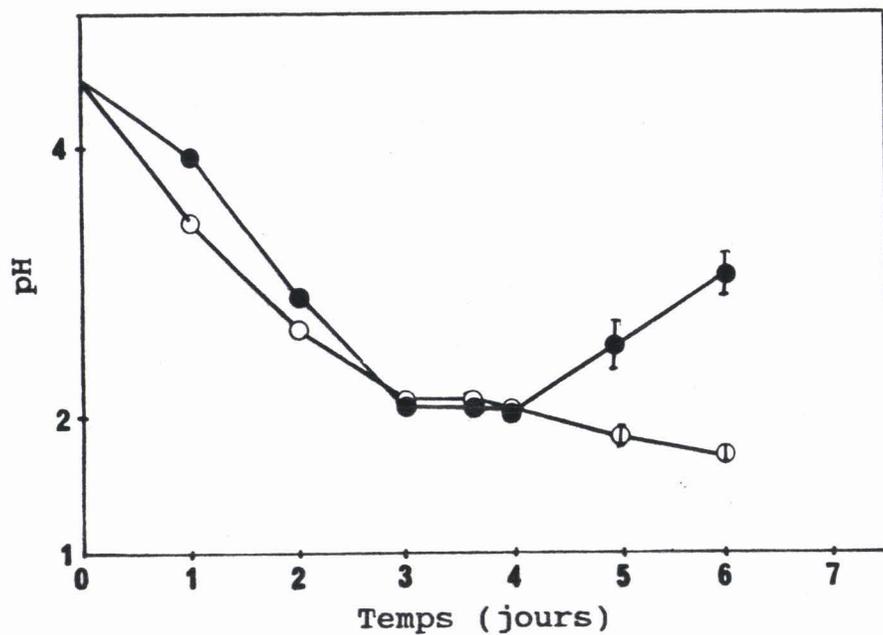


Figure V-7 : Influence des oligoéléments sur le pH d'A. niger.

●● = avec oligoéléments, ○○ = sans oligoélément.

3 - LES OLIGOELEMENTS

Deux types d'expériences ont été conduits pour connaître l'effet des oligoéléments. Dans le premier la matière sèche, le pH et la bioconversion ont été suivis en présence ou en l'absence d'oligoéléments. Dans le deuxième type, nous avons déterminé l'influence de certains ions minéraux particuliers.

3-1 : Elimination totale des oligoéléments

Nous avons réalisé cet essai en retirant les quatre microéléments du milieu de culture qui sont le cuivre, le zinc, le manganèse et le fer ferreux (Annexe III-1).

En l'absence d'oligoéléments la biomasse formée est environ 1,7 fois plus faible que dans le témoin réalisé avec le milieu complet (Figure V-6). Ce résultat est en accord avec ceux publiés par différents auteurs. BERTRAND et DE WOLF (1960) ont constaté que la croissance d'*Aspergillus niger* est inhibée lorsque certains oligoéléments (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} et Mn^{2+}) sont bloqués par des chélateurs. Le rôle de ces microéléments est clairement détaillé dans les ouvrages de HAWKER (1950) et de LILLY et BARNETT (1950) : pour que la croissance de souches comme *Aspergillus niger* soit maximale, le fer et le zinc sont indispensables à des concentrations plus élevées que le cuivre ou le manganèse. Récemment, CHEBOTAREV et NUSHTAEVA (1990) ont enregistré un résultat original : des particules de fer finement dispersées favorisent l'accumulation de la biomasse d'une levure *Saccharomyces carlsbergensis* probablement par activation du métabolisme.

Le rôle des oligoéléments ne se limite pas à une action sur la croissance. Les ouvrages de HAWKER (1950) et de LILLY et BARNETT (1951) rapportent que le fer comme le cuivre entrent en jeu dans la pigmentation des conidies d'*Aspergillus niger*. TOROPOVA et coll.(1989) ont montré que le fer et le manganèse jouent un rôle important dans la formation de

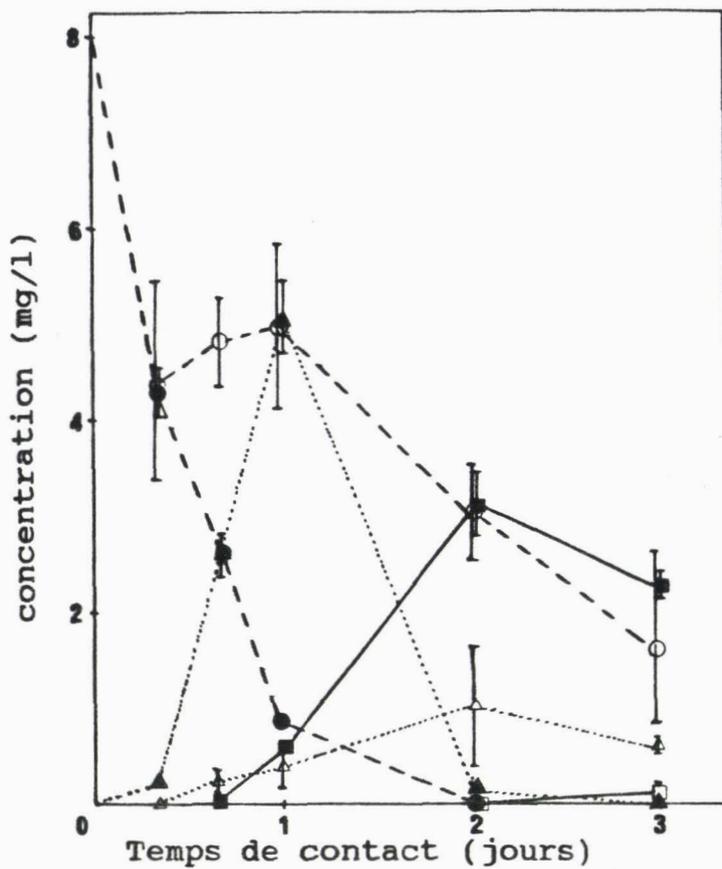


Figure V-8 : Cinétique de la bioconversion : influence des oligoéléments.

Détermination par HPLC. Les essais avec oligoéléments sont représentés avec les symboles noirs, ceux sans oligoélément le sont avec les symboles blancs. ●—● = 44' diméthoxybenzophénone, ▲—▲ = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, ■—■ = 44' dihydroxybenzophénone.

Tableau V-4 : Influence des oligoéléments sur la bioconversion : résultats donnés en mg de produit par gramme de poids sec mycélien.

Temps de contact	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h	
S (mg/g)	sans oligoélément	2,60 (±)0,61	3,34 (±)0,33	3,51 (±)0,59	1,70 (±)0,28	0,91 (±)0,49
	avec oligoéléments	1,11 (±)0,08	0,83 (±)0,05	0,21 (±)0,02	0	0
A (mg/g)	sans oligoélément	0	0,17 (±)0,08	0,27 (±)0,15	0,56 (±)0,36	0,29 (±)0,03
	avec oligoéléments	0,05 (±)0,00	0,81 (±)0,06	1,17 (±)0,09	0,03 (±)0,02	0
B (mg/g)	sans oligoélément	0	0	0	0	0
	avec oligoéléments	0	0	0,14 (±)0,01	0,71 (±)0,13	0,62 (±)0,02

S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone.

pigments et d'antibiotiques chez certains champignons dont un *Hypomyces*. JOHNSON et GOULD (1953) ont constaté que les conidies d'*Aspergillus niger* produites sur milieu contenant du cuivre sont de couleur jaune. Or le cuivre est un cofacteur de certains enzymes intervenant dans la biosynthèse de mélanine ou d'autres pigments comme par exemple la tyrosinase (ANDRAWIS et KAHN, 1985 ; BOYER et coll., 1986). Nous avons remarqué que les "pellets" issus des cultures témoins (sur milieu complet) sont blanc-grisâtre alors que ceux formés sur milieu dépourvu d'oligoéléments sont jaune-citron. De plus à durée de croissance égale leur taille est légèrement inférieure à celle des "pellets" des cultures témoins.

Enfin, nous constatons que la croissance maximale est obtenue en 3 jours dans le témoin (sur milieu complet) alors qu'elle ne semble pas encore atteinte au 6ème jour de culture dans l'essai dépourvu d'oligoéléments. Les différences de pH entre témoin et essai sont peu sensibles (Figure V-7).

La O-déméthylation de la 44' diméthoxybenzophénone est beaucoup moins efficace sur milieu dépourvu d'oligoéléments (Figure V-8). En effet le substrat disparaît plus lentement que dans le témoin mais surtout la 44' dihydroxybenzophénone n'est pas synthétisée. La concentration maximale en composé intermédiaire est divisée par 5 et est atteinte avec 24 heures de retard sur le témoin. La faiblesse de ces valeurs n'est pas la conséquence d'une biomasse moindre : dans le tableau V-4 nous avons ramené les concentrations des différents produits, exprimées en mg/l de milieu, à une même unité de matière sèche, donc en milligrammes de produits par gramme de poids sec mycélien. Nous constatons que les différences sont toujours aussi marquées et que les écarts-types sont beaucoup plus grands sur milieu dépourvu d'oligoéléments, ce qui traduit une mauvaise reproductibilité des résultats. Le système enzymatique responsable de cette bioconversion a donc besoin de tout ou partie des oligoéléments habituellement présents dans notre milieu de culture.

De nombreux enzymes fonctionnent avec des ions métalliques comme cofacteurs. PARK et KIM (1989) ont montré que l'addition de zinc à une culture immobilisée d'*Aspergillus phoenicis* réactive sa capacité à hydroxyler la progestérone.

Mais les effets de ces oligoéléments sont variés. La glyoxalase I d'*Aspergillus niger* est inhibée par le zinc et activée par le fer (INOUE et coll., 1987) ; toujours chez *Aspergillus niger* l'absence de fer provoque une diminution de l'activité spécifique des peroxydases, de l'aconitase, de la catalase... et une augmentation de celle d'enzymes comme la ribonucléase (AGARWALA et coll., 1986b) ; le fer agit favorablement sur l'activité de la benzoate 4-hydroxylase d'*Aspergillus niger* alors que le zinc et le cuivre jouent un rôle négatif (REDDY et VAIDYANATHAN, 1975).

Toutefois il semblerait que généralement le fer ait plutôt un rôle bénéfique contrairement au zinc. Assez récemment, JERNEJC et coll.(1989) ont constaté des variations dans la composition lipidique d'*Aspergillus niger*. La quantité de lipides totaux est 2 fois plus élevée en présence de manganèse que de cuivre qui favorise l'accumulation d'acide citrique. Des différences sont également observées dans les compositions en phospholipides et en acides gras ; les lipides sont des constituants importants des membranes. Les oligoéléments joueraient un rôle tant au niveau des enzymes eux-mêmes (comme cofacteurs) qu'au niveau de la perméabilité membranaire.

3-2 : Rôle particulier de certains oligoéléments

Nous avons étudié le rôle des ions Zn^{2+} et Fe^{2+} en les retirant du milieu de culture puis nous avons observé les effets d'une addition d'ions Fe^{3+} . Ceux-ci sont apportés sous forme de $FeCl_3$ à raison de 0,3 mg/l.

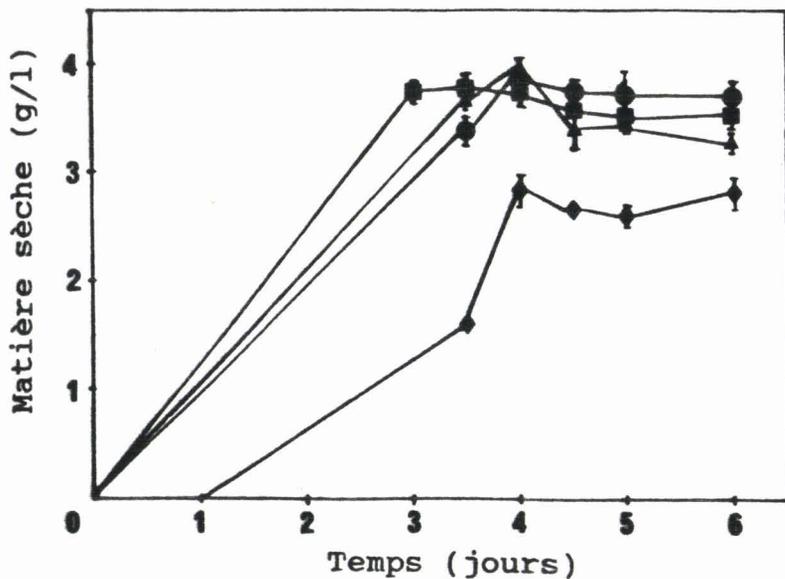


Figure V-9 : Rôle de certains oligoéléments sur la croissance d'*A. niger*.

Milieu : ■—■ = complet (témoïn), ◆—◆ = sans Zn²⁺, ●—● = sans Fe²⁺, ▲—▲ = avec Fe³⁺.

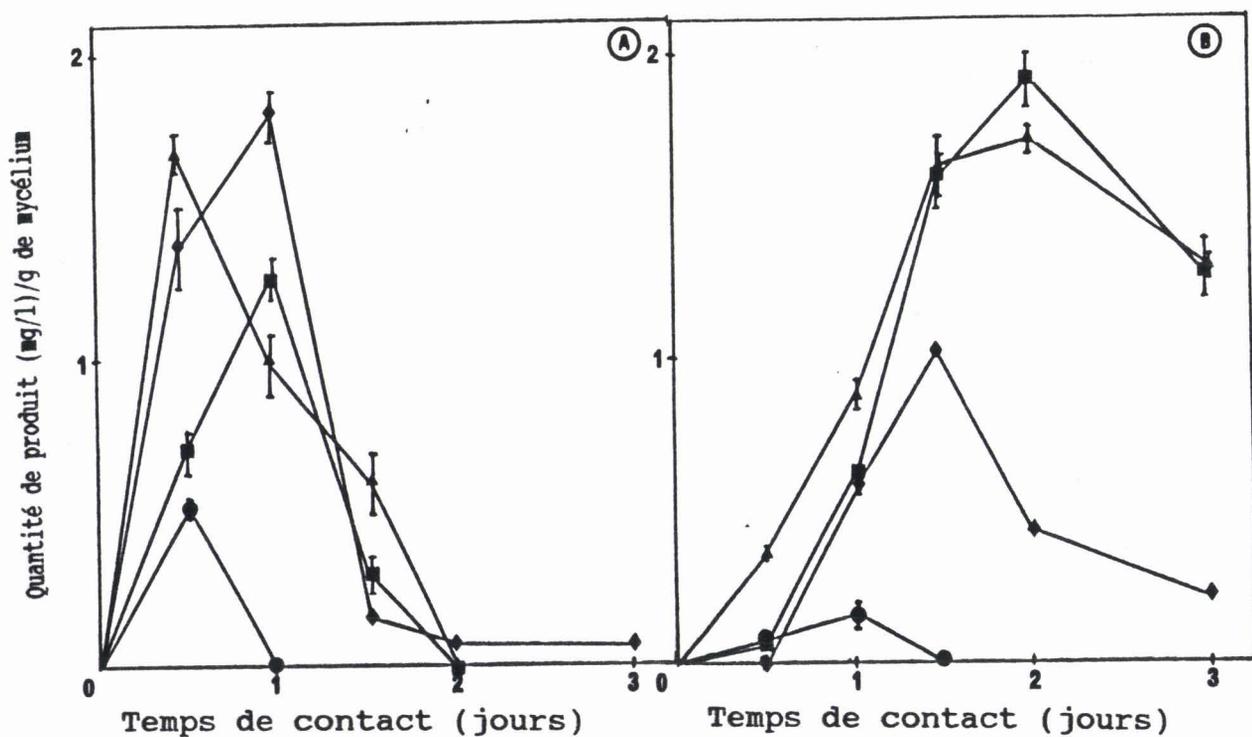


Figure V-10 : Rôle de certains oligoéléments sur la bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone : évolution de la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone (A) et de la 4,4' dihydroxy-4' méthoxybenzophénone (B).

Détermination par HPLC. Milieu : ■—■ = complet (témoïn), ◆—◆ = sans Zn²⁺, ●—● = sans Fe²⁺, ▲—▲ = avec Fe³⁺.

Les résultats sont présentés dans les figures V-9 et V-10.

3-2-1 : Effet du fer

3-2-1-1 : *Suppression des ions ferreux*

La quantité de matière sèche formée n'est pratiquement pas modifiée par l'absence des ions Fe^{2+} : seule la fin de la phase exponentielle de croissance est retardée de 24 heures. La bioconversion démarre à peu près normalement : en 12 heures les différences entre cet essai et le témoin ne sont pas très grandes puis la réaction semble s'arrêter. Nous retrouvons dans le milieu de culture 0,52 milligrammes de dérivé mono-O-déméthylé par gramme de poids sec, contre 1,28 mg/g dans le témoin. De plus ce composé a totalement disparu en 24 heures alors qu'habituellement sa concentration s'accroît entre 12 heures et 24 heures. Cette molécule étant le composé intermédiaire de la réaction de double O-déméthylation, il en résulte une production insignifiante de 44' dihydroxybenzophénone. Les ions ferreux participent donc activement à cette réaction.

3-2-1-2 : *Addition d'ions ferriques*

La courbe de croissance tracée avec les essais additionnés d'ions ferriques est identique à celle de l'essai précédent. Mais dans ce cas la transformation du substrat est accélérée et améliorée : le maximum de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone se situe à 12 heures au lieu de 24 heures et atteint la valeur de 1,68 mg de produit par gramme de poids sec contre 1,27 mg/g dans le témoin. Les biomasses entre cet essai et le témoin étant sensiblement équivalentes, le rendement en présence de Fe^{3+} est meilleur. La vitesse de production de la 44' dihydroxybenzophénone est très largement augmentée notamment en début de réaction : en 12 heures le

coefficient multiplicateur est de 7 entre les témoins et les essais additionnés de Fe^{3+} puis il descend à 1,4 en 24 heures, enfin en 36 heures l'écart n'existe plus.

3-2-1-3 : Discussion

Dans la littérature, le fer est très souvent cité comme effecteur de différentes réactions enzymatiques. GOMEZ et coll. (1985) ont remarqué qu'un milieu synthétique additionné de chlorure ferrique permet la régénération d'une souche d'*Aspergillus niger*. SZCZODRAK et ILCZUK (1985) ont constaté que l'addition de Fe^{2+} augmente grandement l'activité de l'aconitate hydratase mais n'affecte ni la biomasse ni l'utilisation du substrat carboné comme dans notre cas. REDDY et VAIDYANATHAN (1975), grâce à des chélateurs spécifiques de Fe^{2+} ou Fe^{3+} ont montré que la benzoate 4-hydroxylase est plus sensible à une inhibition par des chélateurs du Fe^{2+} que par ceux du Fe^{3+} . De même chez *Pullularia pullulans*, HENDERSON (1961) a mis en évidence une plus grande activation de l'acide protocatéchuïque oxydase par FeSO_4 que par FeCl_3 . Enfin COLOMBIE-BONO (1990) a rapporté le rôle régulateur et antioxydant du fer et a démontré que l'addition de FeCl_3 améliore la production des lignine-peroxydases. Les ions ferriques induiraient une diminution de la réactivité des formes radicalaires de l'oxygène toxiques pour les cellules. Après l'hypothèse d'un enzyme à fer, une action de ce type pourrait expliquer l'amélioration de la bioconversion.

3-2-2 : Suppression du zinc

L'absence des ions Zn^{2+} produit un effet très différent de celui des deux précédents. Tout d'abord le champignon ne se développe pas aussi bien que dans le témoin : la phase de latence est plus longue - 24 heures après l'ensemencement aucune croissance n'est observable - et la biomasse est moindre : 2,83 g/l contre 3,79 g/l dans le témoin.

Ce résultat peut s'expliquer par les remarques de HAWKER (1950) et LILLY et BARNETT (1951) qui précisent que le zinc joue un rôle dans l'utilisation des sucres en favorisant leur oxydation et leur assimilation complètes.

LABOREY et LAVOLLAY (1967) ont également montré qu'*Aspergillus niger* voit sa biomasse s'accroître avec des teneurs en Zn^{2+} plus élevées à condition que la concentration en Mg^{2+} soit suffisante. L'équilibre Mg^{2+}/Zn^{2+} est donc important, or dans notre expérience il est modifié puisque nous supprimons les ions Zn^{2+} sans changer les concentrations des autres constituants du milieu.

Dans cet essai nous obtenons des "pellets" jaune-citron, contrairement à ceux formés dans le témoin ou dans les essais sans Fe^{2+} ou avec Fe^{3+} qui sont blanc-grisâtre. Cette coloration, déjà remarquée dans l'essai sans aucun oligoélément, résulterait donc de l'absence de zinc. HAWKER (1950) signale aussi que dans un milieu avec une faible concentration en zinc, les cultures d'*Aspergillus niger* restent blanches car elles ne forment pas de conidies.

Enfin la transformation du substrat en 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone est plus efficace que dans le témoin mais ce n'est pas le cas de la deuxième O-déméthylation.

La quantité de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone formée par unité de matière sèche 12 heures et 24 heures après l'addition du substrat est plus grande que celle obtenue dans le témoin. A 12 heures, bien que le rapport produit formé/biomasse soit supérieur à celui du témoin, la concentration en 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone est inférieure à celle du témoin (2,24 mg/l contre 2,60 mg/l dans le témoin). En 24 heures le résultat s'inverse : la concentration en ce produit est de 5,11 mg/l dans l'essai sans zinc pour 4,83 mg/l dans le témoin.

En revanche la 4,4' dihydroxybenzophénone est

formée en moins grande quantité en l'absence de zinc. Jusqu'à 24 heures il n'y a pas de différence entre l'essai sans zinc et le témoin. En 36 heures la quantité de produit par unité de matière sèche est passée de 0,59 mg/g à 1,09 mg/g mais reste très en deçà des 1,60 mg/g obtenus dans le témoin. Les résultats exprimés en mg/l vont aussi dans le même sens : dans l'essai sans zinc nous avons 2,93 mg/l de produit dihydroxylé contre 5,76 mg/l dans le témoin. Par la suite, cette quantité décroît beaucoup plus rapidement pour arriver à 0,22 mg/g contre 1,27 mg/g dans le témoin.

Le champignon privé de zinc aurait des difficultés à O-déméthyliser en totalité le substrat ce qui entraînerait une accumulation du composé intermédiaire dans les premières heures de la réaction. Le zinc serait donc un activateur de la réaction.

De très nombreux autres enzymes fonctionnent grâce à cet ion : nous pouvons citer l'anhydrase carbonique, la carboxypeptidase ou encore l'énolase. Par contre certains enzymes sont inhibés par le zinc : par exemple la 4-nitrophénylphosphatase (VERSAW et coll., 1991) et, pour des concentrations égales ou supérieures à 0,5 mM, la glyoxalase I d'*Aspergillus niger* (HOCKERTZ et coll. 1987 ; INOUE et coll. 1987).

4 - CONCLUSION

Dans ce chapitre nous avons passé en revue quelques facteurs nutritifs pouvant intervenir au niveau soit de la croissance, soit de la bioconversion.

Après avoir essayé d'autres sources carbonées comme le lactate ou le glycérol, et devant des taux de bioconversions plus faibles, le choix du glucose a été maintenu. Dans notre cas, il ne semble pas affecter la réaction étudiée et nous avons établi qu'une concentration en glucose de

10 g/l permet une transformation rapide et totale du substrat. La cinétique de la bioconversion suivie par HPLC a montré que le substrat disparaît intégralement en 24 heures et que dans le même temps le produit intermédiaire atteint son maximum. Puis en 48 heures ce dernier a disparu à son tour pour laisser la place à la 44' dihydroxybenzophénone qui présente son point le plus élevé à ce moment là. Le rendement de la bioconversion est égal à 65% et la productivité en 44' dihydroxybenzophénone est de 2,31 mg/l/jour.

Enfin nous avons réalisé une étude sur l'influence des oligoéléments. leur élimination totale empêche le mycélium de croître normalement : la biomasse est 1,7 fois plus faible que dans un essai sur milieu normal. En outre la bioconversion est presque totalement inhibée : la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone est produite en quantité 5 fois moindre et la 44' dihydroxybenzophénone n'est pas formée.

Une étude plus fine sur le rôle de certains oligoéléments a été conduite.

L'absence de fer ferreux perturbe gravement la O-déméthylation de la 44' diméthoxybenzophénone : la concentration maximale en composé intermédiaire est 2,5 fois plus faible que dans le témoin et la production de 44' dihydroxybenzophénone est insignifiante. En revanche l'addition de fer ferrique augmente la vitesse de cette réaction : la valeur maximale du composé intermédiaire se situe à 12 heures au lieu de 24 heures et est 1,3 fois plus grande que celle du témoin. Il en est de même pour la 44' dihydroxybenzophénone dont les quantités formées en 12 heures sont 7 fois plus importantes dans l'essai que dans le témoin mais la concentration finale n'étant pas augmentée, l'écart se resserre pour être nul en 36 heures.

Les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} ont donc un rôle activateur de cet ou ces enzymes.

L'absence de Zn^{2+} provoque une accumulation plus

importante de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et une diminution du composé dihydroxylé ; il faut donc supposer que l'absence de cet oligoélément entraîne une diminution de la vitesse ainsi qu'une inhibition de la réaction.

De plus lors de l'élimination du zinc, et même du fer, nous constatons que malgré des baisses plus ou moins significatives des rendements, ceux-ci ne sont jamais tombés aussi bas que lors de l'élimination complète des 4 oligoéléments. Deux explications peuvent être proposées : le manganèse mais surtout le cuivre seraient indispensables à la transformation du substrat encore plus que le fer ferreux ; l'effet d'une élimination totale des oligoéléments serait supérieur à la sommation des effets de chacun des oligoéléments pris un à un.

CHAPITRE VI

INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT PHYSICO-CHIMIQUE

1 - INTRODUCTION

Après avoir étudié le rôle des différents éléments nutritifs sur la bioconversion, il nous a semblé que certains paramètres physiques pouvaient améliorer le rendement de la réaction et modifier l'interaction champignon-substrat.

En premier lieu, nous avons recherché les effets de l'oxygénation sur notre réaction. Le rôle de l'oxygène dans la production d'acide citrique par *Aspergillus niger* a été fréquemment commenté. Dans un but d'optimisation, CHMIEL (1987) a proposé un modèle mathématique applicable à l'assimilation de l'oxygène. DAWSON et coll. (1986) ont procédé à des interruptions de l'aération, variables en durée, et en ont examiné les effets sur la cinétique de production de l'acide citrique. Ces suppressions d'oxygène ont été réalisées soit en stoppant l'alimentation en air et en arrêtant l'agitation, soit en remplaçant l'air par un courant d'azote. Dans un autre domaine, les influences de l'aération et de l'agitation sur la production d'enzymes pectinolytiques en fermenteur ont été

démonstrées par FRIEDRICH (1989).

La concentration en ions hydrogène est également connue pour jouer un rôle déterminant dans la croissance (HAWKER, 1950 ; SMITH et BERRY, 1975) mais aussi dans la production d'acides organiques par l'intermédiaire des pH optima de différents enzymes (ROUKAS et HARVEY, 1988). Les rôles de l'agitation, de la concentration en oxygène dissous et du pH sont également détaillés dans les ouvrages de SMITH et BERRY (1975), SMITH et PATEMAN (1977) et notamment dans l'article de BERRY et coll. (1977) traitant de la production d'acide citrique par *Aspergillus niger*.

La lumière est un autre élément pouvant avoir un effet sur le rendement de la réaction par un processus direct (activation ou inhibition de l'enzyme) ou indirect (influence sur la croissance ou la perméabilité mycéliennes) (LEACH, 1971). Cet auteur, ainsi que WEINHOLD et HENDRIX (1963), ont constaté que l'exposition des milieux de culture à une lumière ultraviolette, pouvait décomposer partiellement les hydrates de carbone ou former des peroxydes toxiques pour les cellules.

Les détergents peuvent aussi agir sur la production d'enzymes comme les laccases (AMIN et coll., 1985), les enzymes à cytochrome P-450 (AMBIKE et BAXTER, 1970) ou les ortho- ou para-diphénol-oxydases (WALKER et MC CALLION, 1980). Ces effets n'étant pas négligeables, il semble tout à fait justifié d'en entreprendre l'étude.

2 - FACTEURS PHYSIQUES

2-1 : L'oxygénation

Nous avons réalisé 2 expériences, la 1ère en réduisant l'oxygénation par arrêt de l'agitation, la 2ème en remplaçant l'air par l'azote pur. Dans les deux cas la concentration en glucose est de 2 g/l (Annexes III-1).

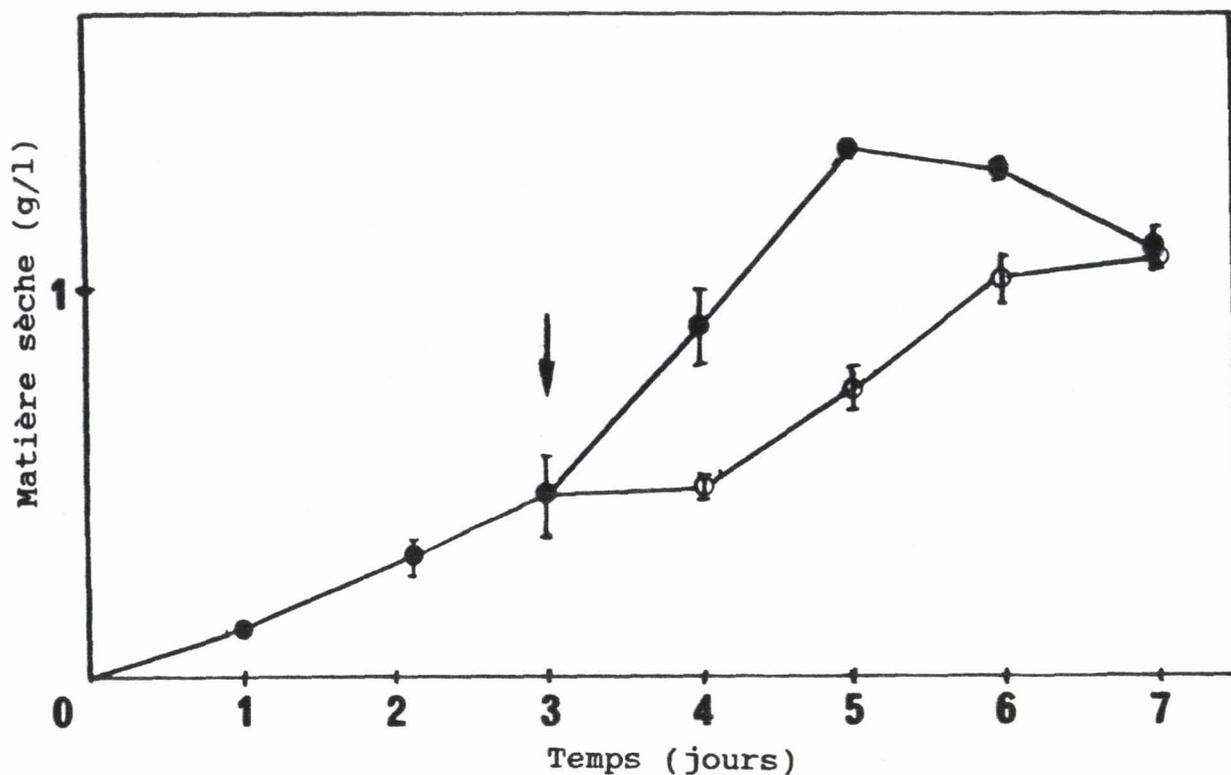


Figure VI-1 : Evolution de la matière sèche en conditions statiques.

La flèche indique le moment d'addition du substrat. ●—● = témoin (sans addition de substrat), ○—○ = après addition de substrat.

Tableau VI-1 : Bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone en conditions statiques.

Temps de contact	24 h	48 h	72 h	96 h
Produits	(+) S (±) A	S (+) A (±) B	S (+) A (±) B	S (+) A B

Estimation à partir de CCM. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Quantité de S, A ou B : (±) = faible, (+) = forte, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée comme moyenne.

L'extraction et l'analyse des composés sont réalisées suivant les conditions énoncées dans l'annexe IV-2.

2-1-1 : Transformation en conditions statiques

Du fait de l'absence d'agitation il n'y a pas formation de "pellets". Le champignon croît en surface sous forme d'une nappe mycélienne. L'évolution de la matière sèche est reportée sur la figure VI-1. Le maximum de croissance est atteint au 5ème jour avec 1,35 g/l de mycélium sec.

Avec une même concentration en glucose, sous agitation alternative, la croissance est maximale au 3ème jour de culture pour un poids de matière sèche de 1,28 g/l (Figure V-3). En conditions statiques, la vitesse de croissance est diminuée mais la masse mycélienne formée est comparable. L'addition de la 44' diméthoxybenzophénone a lieu au 3ème jour de culture alors que la croissance n'est pas terminée. Comme lors des essais d'addition du substrat à différents stades de la croissance (Chapitre IV, paragraphe 2), nous enregistrons une diminution de la vitesse de croissance et un décalage du début de la phase stationnaire de 24 heures.

La transformation de la 44' diméthoxybenzophénone est elle aussi ralentie (Tableau VI-1). En 24 heures il reste beaucoup de substrat et la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone apparaît faiblement. Après 48 heures de contact, comme en 72 heures, la quantité de produit intermédiaire est plus importante et la 44' dihydroxybenzophénone commence à être synthétisée. Enfin en 96 heures, les taches chromatographiques des 2 produits de la réaction présentent une intensité identique. Si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus en conditions d'agitation (Tableau V-3) nous constatons que les temps d'apparition des produits sont plus longs : il faut 48 heures, de contact au lieu de 24 heures, pour la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et 96 heures, au lieu de 48 heures, pour la 44' dihydroxybenzophénone. En outre dans l'essai avec

agitation, le substrat avait diminué dès 72 heures de contact et disparu en 96 heures, alors qu'en conditions statiques il n'a pas encore diminué au bout de 96 heures.

L'agitation intervient favorablement dans la bioconversion soit en améliorant l'oxygénation du milieu en favorisant les contacts entre le champignon et le substrat. Dernièrement ROUKAS (1991) a montré qu'en cuve de fermentation, le rendement en acide citrique et les activités de certains enzymes, comme la citrate synthétase, sont directement dépendant de la vitesse d'agitation.

2-1-2 : Transformation sous atmosphère d'azote

Deux séries d'expériences ont été conduites en parallèle. Dans la 1ère, les fioles d'Erlenmeyer sont placées sous atmosphère d'azote immédiatement après l'ensemencement. Dans la 2ème, nous avons laissé pousser le champignon pendant 3 jours avant d'introduire de l'azote dans les fioles.

Dans le 1er cas, nous avons contrôlé l'évolution de la croissance d'*Aspergillus niger* : aucune différence significative n'a été enregistrée par rapport à la croissance en statique.

Ces essais ont été suivis pendant 96 heures mais aucune transformation de la 44' diméthoxybenzophénone n'a eu lieu. Dans la littérature, nous avons constaté que des expériences similaires avaient abouti à un résultat identique. Par exemple au cours des multiples réactions conduisant à la biosynthèse de la patuline, le méta-crésol subit 2 hydroxylations pour arriver à l'alcool gentisylrique. MURPHY et coll. (1974) ont montré que l'azote pur inhibe totalement ces activités hydroxylasiques. Cette même équipe (MURPHY et LYNNEN, 1975) a ensuite établi qu'un faible apport d'oxygène (5% pour 95% d'azote) restitue 82 à 98% de l'activité. Par rapport à l'air, une alimentation avec de l'oxygène pur ne permet aucun

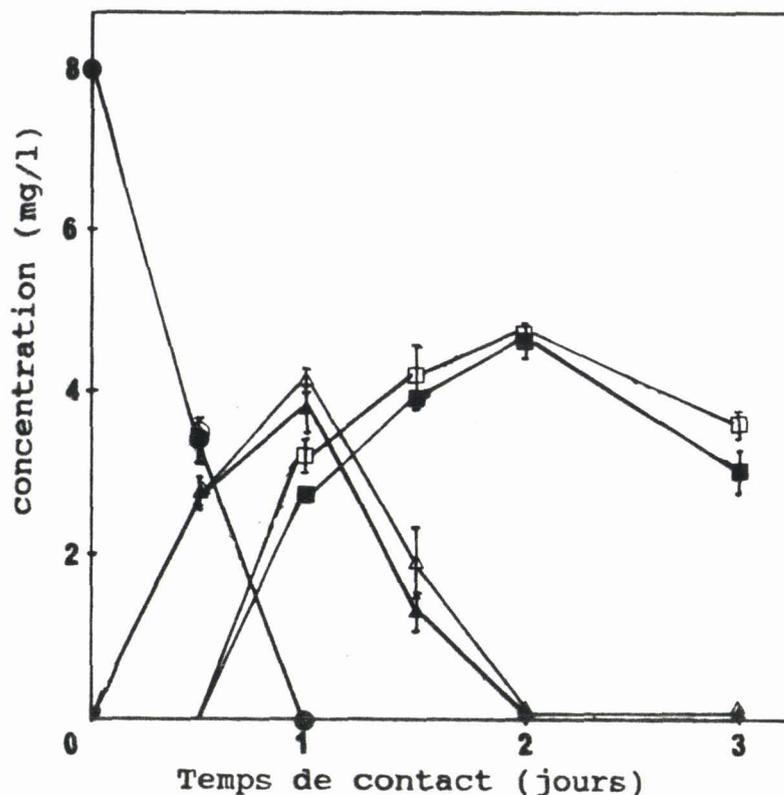


Figure VI-2 : Influence d'un éclairage en lumière blanche sur la bioconversion.

Détermination par HPLC. Les essais à l'obscurité sont représentés avec les symboles noirs, ceux sous éclairage le sont avec les symboles blancs. ●—● = 44' diméthoxybenzophénone, ▲—▲ = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, ■—■ = 44' dihydroxybenzophénone.

Tableau VI-2 : Influence de l'éclairage sur la quantité de biomasse formée.

Temps de contact	24 h	36 h	48 h	72 h
Moyenne des poids secs à la lumière (g/l)	3,284 (±)0,029	3,403 (±)0,053	3,239 (±)0,055	3,361 (±)0,029
Moyenne des poids secs à l'obscurité (g/l)	3,565 (±)0,035	3,650 (±)0,010	3,541 (±)0,069	3,628 (±)0,072

gain d'activité.

En conditions statiques, la vitesse de la réaction est diminuée de manière appréciable tandis que sous atmosphère d'azote, la bioconversion est totalement inhibée. Nous pouvons en conclure que l'oxygénation du milieu, grâce à l'aération et l'agitation, est une nécessité pour la O-déméthylation de la 44' diméthoxybenzophénone.

2-2 : La lumière

Lors des essais préliminaires (Chapitre I), nous nous sommes déjà penchés sur le rôle tenu par ce facteur. Après évaluation visuelle par CCM, nous avons conclu que la lumière n'était pas indispensable à la O-déméthylation. Toutefois, nous avons réalisé une nouvelle expérience destinée à déterminer avec une plus grande précision l'influence de la lumière blanche mais aussi de la lumière ultraviolette. La mise en oeuvre de l'expérimentation est décrite antérieurement (Annexes III-1 et III-2) ; les conditions lumineuses sont détaillées en annexe VI-1.

Si nous comparons les résultats des essais sous lumière blanche à ceux obtenus à l'obscurité (Figure VI-2) nous ne constatons pas de différences significatives aussi bien pour la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone que pour la 44' dihydroxybenzophénone. Nous remarquons simplement qu'un peu plus de biomasse se forme à l'obscurité qu'à la lumière (Tableau VI-2).

Ces résultats confirment ceux enregistrés au cours des essais préliminaires et prouvent que, contrairement à ce qui se passe avec la benzophénone, le système enzymatique responsable de la bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone est photoindifférent.

Les UV agissent peu sur la bioconversion : les

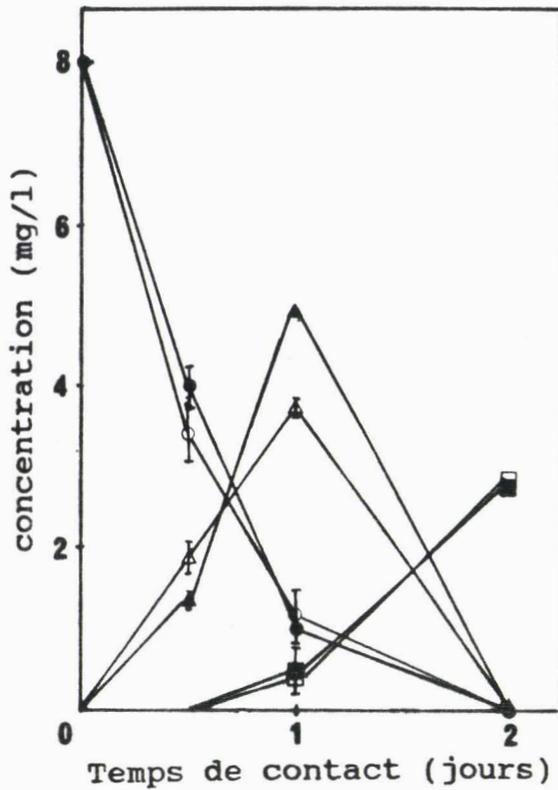


Figure VI-3 : Influence des UV sur la bioconversion.

Détermination par HPLC. Les essais à l'obscurité sont représentés avec les symboles noirs, ceux sous éclairage le sont avec les symboles blancs. ●—● = 44' diméthoxybenzophénone, ▲—▲ = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, ■—■ = 44' dihydroxybenzophénone.

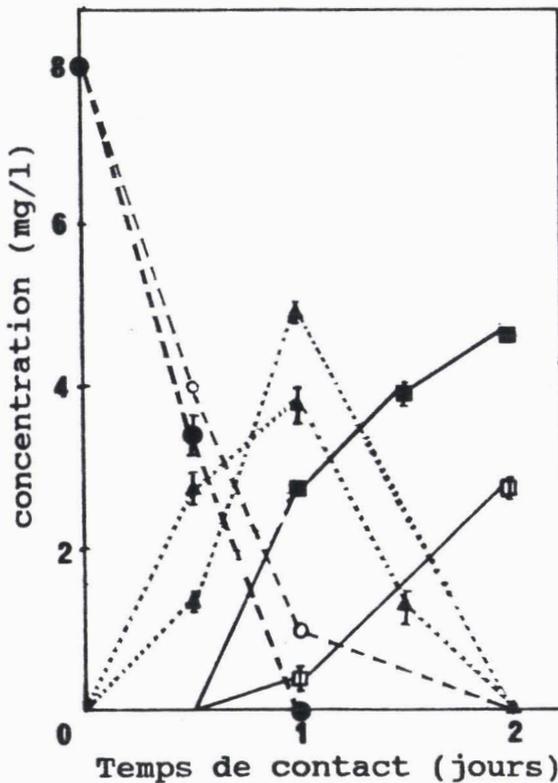


Figure VI-4 : Influence de l'agitation sur la bioconversion.

Détermination par HPLC. Résultats obtenus avec de agitateur de 10 cm d'amplitude et 80 AR/min (symboles noirs) et un de 2 cm d'amplitude et 130 AR/min (symboles blancs). ●—● = 44' diméthoxybenzophénone, ▲...▲ = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, ■—■ 44' dihydroxybenzophénone.

valeurs du substrat et de la 44' dihydroxybenzophénone ne sont pas significativement affectées par ces radiations (Figure VI-3), seule la valeur maximale du composé intermédiaire est plus faible sous lumière ultra-violette qu'à l'obscurité.

Par contre pour les valeurs des 2 témoins "obscurité" (Figure VI-4), les différences sont flagrantes. Ainsi qu'il est indiqué en annexe VI-1, l'expérience sur l'influence de la lumière blanche a été réalisée sur un agitateur alternatif dont l'amplitude est de 10 cm et la fréquence de 80 allers-retours par minute alors que pour celle sur l'influence des radiations ultraviolettes, nous avons utilisé un agitateur de même type mais avec une fréquence de 130 mouvements par minute et une amplitude de 2 cm. Or dans cette dernière expérience, nous constatons que le substrat disparaît moins vite puisqu'il en reste encore après 24 heures, que la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone accumulée dans le milieu est moitié plus faible en 12 heures mais surtout que la production de 44' dihydroxybenzophénone est très perturbée. Un mouvement de va et vient plus rapide couplé à une amplitude plus restreinte a donc un effet négatif sur la bioconversion. Les aspects morphologiques d'une expérience à l'autre étant identiques, nous en concluons que ces variations de vitesse et d'amplitude modifient essentiellement les interactions entre le champignon et le substrat.

Une plus grande quantité de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone en 24 heures n'est pas un résultat incompatible avec une bioconversion ralentie. En effet, ce composé étant le point de départ de la 2ème O-déméthylation, il est logique qu'il se soit accumulé puisque le produit de cette réaction tarde à apparaître.

2-3 : Le pH

Pour tester l'effet du pH sur la bioconversion nous avons utilisé la méthode présentée en annexe VI-2. La

Tableau VI-4 : Influence du pH sur la bioconversion.

pH	Tampon	24 h	48 h	72 h
4,5	DMS	(+) A B	(±) A B	(±) A B
	Lactate	(±) A (+) B	(±) A (+) B	(+) B
5,5	DMS	(+) A B	(±) A (+) B	(±) A (+) B
	MES	(+) A (±) B	(±) A (+) B	(±) A (+) B
	Tris-maléate	(+) A (±) B	(±) A (+) B	(±) A (+) B
6,5	MES	(+) A (±) B	(±) A (+) B	(±) A (+) B
	Tris-maléate	(+) A (±) B	(±) A (+) B	(±) A (+) B
7,5	HEPES	(+) A (±) B	A B	(±) A (+) B
	Tris-HCl	S (+) A (±) B	A B	(±) A (+) B
	Tris-maléate	S (+) A (±) B	A B	(±) A (+) B
8,5	Tris-HCl	(+) S A	(+) A (±) B	(+) A (±) B
	Tris-maléate	(+) S (±) A	(+) A (±) B	(+) A (±) B

Estimation à partir de CCM. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Quantité de S, A ou B : (±) = faible, (+) = forte, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée comme moyenne.

bioconversion a été conduite dans différents tampons à 50 mM pour des pH compris entre 4,5 et 8,5 avec des variations d'une unité pH. Le tableau VI-3 nous donne la nature des tampons utilisés en fonction du pH. Pour une même valeur de pH nous remarquons qu'au moins deux tampons différents sont testés ceci pour prendre en compte un éventuel effet de la nature du tampon.

Tableau VI-3 : Nature des tampons utilisés en fonction du pH.

pH	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5
TAMPONS	DMS Lactate	DMS MES Tris- Maléate	MES Tris- Maléate	HEPES Tris-HCl Tris- Maléate	Tris-HCl Tris- Maléate

DMS : Diméthylsuccinate

MES : acide 2-(N-morpholino)éthane sulfonique

HEPES : acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthane sulfonique

Pour toutes les valeurs de pH testées et quelle que soit la nature du tampon, la transformation de la 44' diméthoxybenzophénone a lieu mais les réponses ne sont pas strictement identiques (Tableau VI-4).

En 24 heures, le substrat a été totalement mono- ou di-O-déméthylé pour les pH 4,5 à 6,5 ainsi qu'à pH 7,5 dans l'HEPES. Par contre dans les 2 tampons à pH 8,5, la 44' dihydroxybenzophénone n'est pas encore synthétisée.

En 48 heures la réaction se poursuit normalement : la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone disparaît au profit de la 44' dihydroxybenzophénone de pH 4,5 à 6,5. A pH 7,5 le substrat a entièrement disparu, mais la quantité de 44' dihydroxybenzophénone présente est plus faible qu'avec les pH précédents. Enfin à pH 8,5, le substrat disparaît et la 44' dihydroxybenzophénone apparaît.

En 72 heures de pH 4,5 à 6,5, aucune évolution n'est enregistrée car les quantités maximales de produit dihydroxylée ont été atteinte en 48 heures. A pH 7,5 la transformation se poursuit pour obtenir les mêmes résultats qu'avec les pH acides. Par contre à pH 8,5, la bioconversion semble arrêtée : nous avons une forte quantité de produit mono-O-déméthylé et une très faible quantité de 44' dihydroxybenzophénone

La nature du tampon intervient assez peu dans la réaction hormis à pH 4,5 : l'utilisation du tampon lactate augmente la vitesse de réaction puisqu'en 24 heures il ne reste pratiquement plus de produit intermédiaire et le dérivé dihydroxylé est déjà majoritaire.

Nous constatons que pour les pH 4,5 à 6,5, le déroulement de la bioconversion est identique à celui réalisé jusqu'à présent en milieu de culture : disparition du substrat et pic d'accumulation de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone en 24 heures puis effondrement de ce produit et maximum de 44' dihydroxybenzophénone atteint en 48 heures. Pour des pH plus alcalins, la vitesse de réaction est diminuée et notamment à pH 8,5, le dérivé dihydroxylé semble ne pas pouvoir se former aisément.

Dans le chapitre IV, nous avons montré que les filtrats de culture d'*Aspergillus niger* ne sont pas capables de O-déméthyliser la 44' diméthoxybenzophénone. Nous en avons déduit que le ou les enzymes responsables de cette réaction ne sont pas extracellulaires. Les résultats de cette étude sur le pH confirment cette hypothèse : il faut supposer que le système enzymatique est intracellulaire ou éventuellement membranaire pour expliquer qu'il continue à fonctionner sans grandes perturbations malgré des variations de pH importantes. En effet, BERRY (1975) précise que le pH interne des cellules est indépendant de celui du milieu extérieur et que les variations

de celui-ci n'affectent que des phénomènes de surface comme la perméabilité.

3 - INFLUENCE DES DETERGENTS

De nombreux auteurs ont étudié le rôle des détergents sur diverses activités enzymatiques. WALKER et MC CALLION (1980) ont travaillé sur des ortho- et para-diphénol oxydases de végétaux et de champignons. Ils ont montré que toutes les ortho-diphénol oxydases sont activées par des détergents anioniques (notamment le sodium dodécyl sulfate) tandis que l'ensemble des para-diphénol oxydases est inhibé par des détergents cationiques (par exemple le bromure de cétyltriméthylammonium - CTAB).

Parmi les détergents non ioniques certains comme le Triton X-100 ont un effet négatif en particulier sur la cinnamate 4 hydroxylase (HILL et RHODES, 1975) ou sur la lipase (de LABORDE de MONPEZAT, 1990) alors que d'autres comme les tween améliorent la production de lignine-peroxydase (COLOMBIÉ-BONO, 1990) ou l'activité hydroxylante de cellules libres ou immobilisées (BUKHAR et coll., 1980).

Nous avons choisi de tester un détergent non ionique, le tween 80, et un zwitterionique, le CHAPS, à 2 concentrations. Après avoir constaté une accélération de la transformation dans un de ces essais, nous avons tenté d'améliorer encore la O-déméthylation par addition d'une même quantité de détergent au moment de la bioconversion.

3-1 : Effet de la nature et de la concentration en détergents

L'essai avec le détergent non ionique est réalisé avec le tween 80 ou polyoxyéthylène sorbitan monooléate ; celui avec le détergent zwitterionique fait appel au CHAPS ou 3-(3-

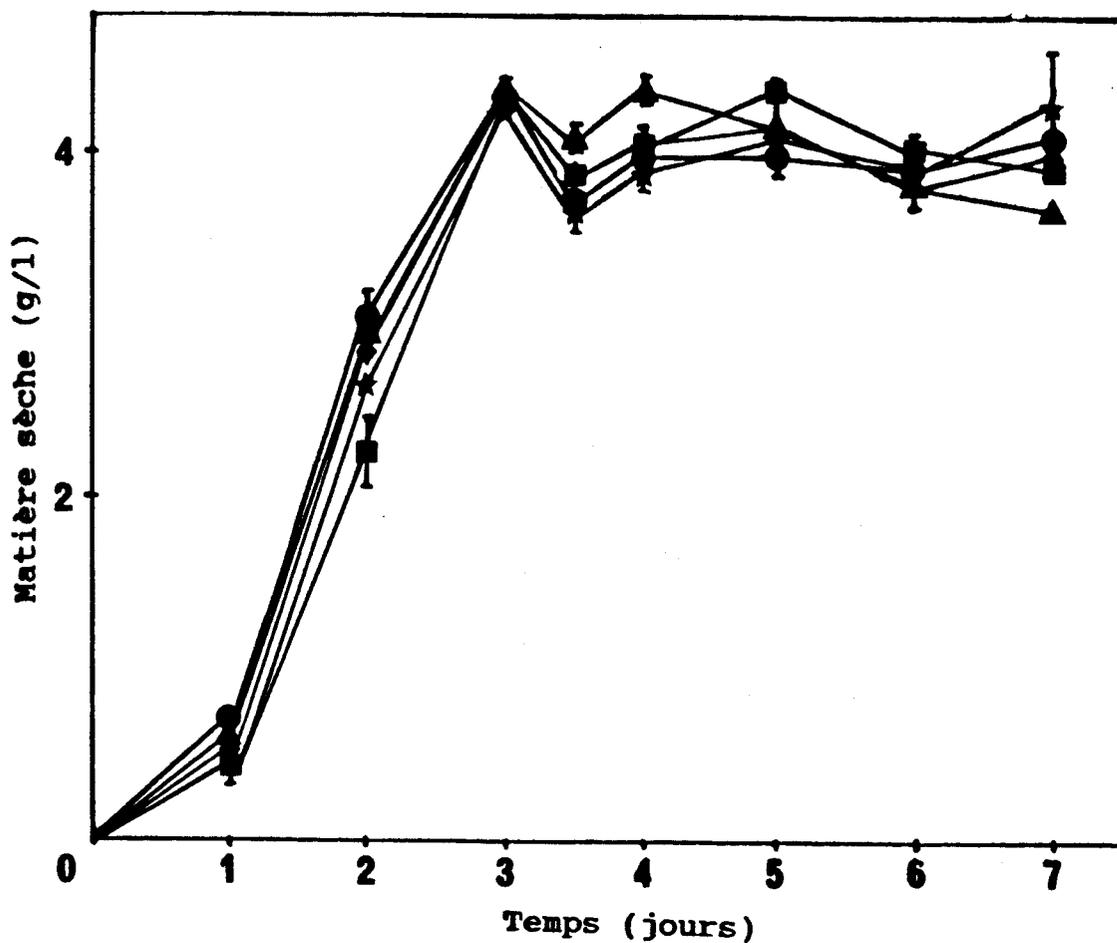


Figure VI-5 : Evolution du poids sec en présence de détergents à différentes concentrations.

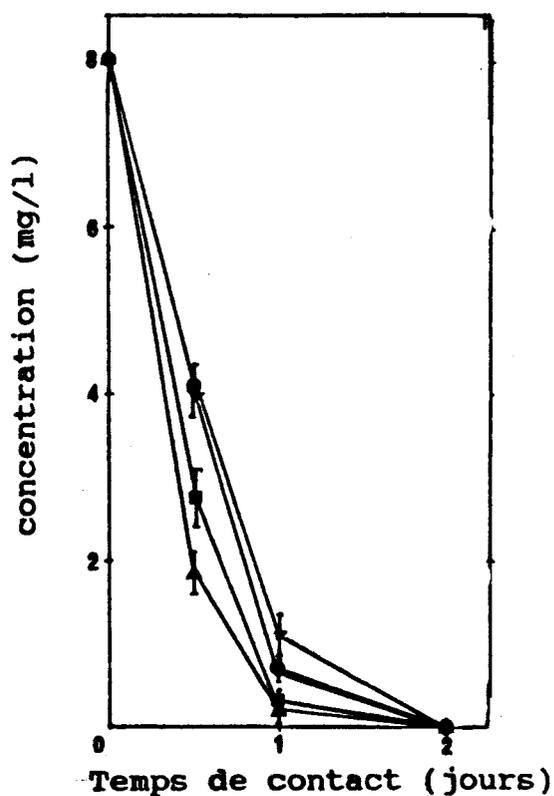


Figure VI-6 : Influence des détergents sur la concentration en substrat.

Détermination par HPLC. Milieu : ●—● = sans détergent, avec du tween 80 à : ▲—▲ = 0,05%,
 ■—■ = 0,1%, avec du CHAPS à : ◆—◆ = 0,05%, *—* = 0,1% .

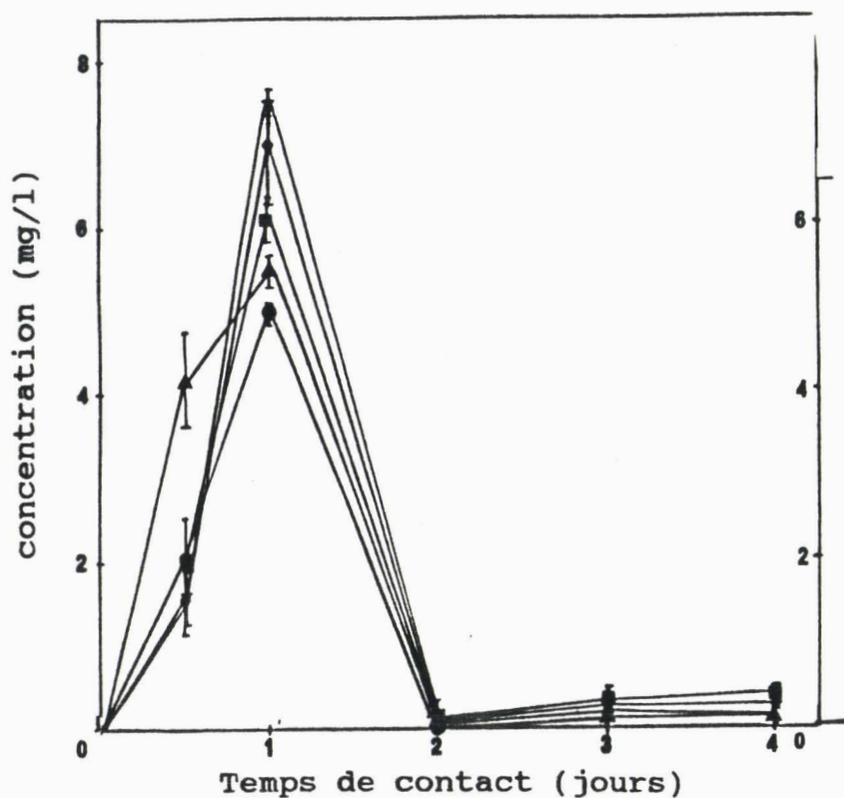


Figure VI-7 : Influence des détergents sur la concentration en 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone.

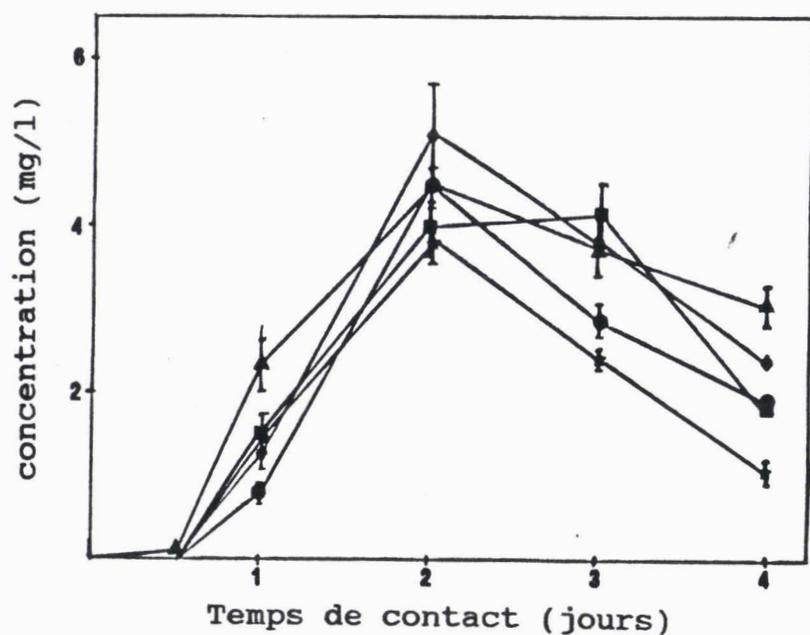


Figure VI-8 : Influence des détergents sur la concentration en 4,4' dihydroxybenzophénone.

Détermination par HPLC. Milieu : ●—● = sans détergent, avec du tween 80 à : ▲—▲ = 0,05%, ■—■ = 0,1%, avec du CHAPS à : ◆—◆ = 0,05%, *—* = 0,1% .

cholamidopropyl)-diméthyl-ammonio 1-propanesulfonate. Les concentrations utilisées sont celles le plus fréquemment reprises dans la littérature soit 0,05% et 0,1% (P/V). Ces détergents sont ajoutés aux milieux de culture lors de leurs préparations. La croissance du champignon est assez peu affectée par leurs présences (Figure VI-5). A contrario, TAKAHASHI et coll. (1965) ainsi qu'ELMAYERGI et coll. (1973), ont prouvé que la croissance d'*Aspergillus niger* pouvait être modifiée en présence de détergents. Toutefois ils ont attribué ces modifications à une meilleure dispersion des spores au sein du milieu de culture or dans nos essais nous ensemençons avec une suspension de spores préparées avec du tween ; il y a donc dès le départ une dispersion correcte des spores.

Par contre, l'adjonction de détergents agit sur la O-déméthylation de la 44' diméthoxybenzophénone (Figures VI-6, VI-7 et VI-8). Avec les 2 concentrations en CHAPS, les courbes de disparition du substrat sont identiques à celle du témoin, tandis qu'avec le tween 80, notamment à 0,05%, le substrat disparaît plus vite. Dans tous les cas, avec la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone les maxima sont obtenus en 24 heures, mais en présence de détergents les concentrations sont comprises entre 5,5 et 7,5 mg/l alors qu'en leur absence elle est de 5 mg/l. En outre en 12 heures avec le tween 80 à 0,05%, nous constatons que la concentration en dérivé mono-O-déméthylé est 2 fois plus forte que dans le témoin ou les autres essais. La productivité calculée sur les 12 premières heures est donc meilleure : 8,35 mg/l/jour contre 4,13 mg/l/jour dans le témoin.

En ce qui concerne le produit final, les courbes ont le même aspect général. Toutefois en 24 heures, nous remarquons que la concentration en produit obtenue avec le tween 80 à 0,05% est 3 fois plus élevée que dans le témoin. La productivité calculée sur les premières 24 heures est de 2,33 mg/l/jour contre 0,79 mg/l/jour dans le témoin. Cette différence n'existe plus en 48 heures : dans les 2 cas la productivité est de 2,24 mg/l/jour. Toujours en 48 heures, la

quantité la plus importante est obtenue avec le CHAPS à 0,05% mais les différences ne sont pas significatives étant donné les valeurs des écarts-type.

Cette étude révèle l'action particulière du tween 80 à 0,05% : la bioconversion du substrat est accélérée. En effet, le substrat est plus rapidement utilisé que dans le témoin : il est transformé en 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone puisqu'en 12 heures sa concentration est plus élevée que dans le témoin. La 2ème O-déméthylation est également activée puisqu'en 24 heures nous constatons que le produit final est plus rapidement formé. Nous pouvons donc en conclure que le tween 80 à 0,05% agit directement et positivement sur la O-déméthylation de la 44' diméthoxybenzophénone.

L'action des tween sur les productions enzymatiques ou les bioconversions est un phénomène largement répandu. AMIN et coll. (1985) ont démontré que l'addition de 1% de tween 60 accroît la production de laccase d'environ un facteur 3. BAKLASHOVA et KOSHCHEENKO, (1980) ont constaté qu'avec du mycélium libre d'*Aspergillus niger*, l'hydroxylation de l'acide 3-indole acétique est stimulée en présence de plusieurs détergents. Lorsque le mycélium est immobilisé, l'addition de tween 80 au milieu de transformation ne modifie pas l'activité hydroxylante mais si, avant la transformation, les billes de mycélium immobilisé sont préincubées dans une solution contenant ce détergent, l'activité est plus que doublée (BAKLASHOVA et coll., 1984).

Les détergents sont supposés faciliter les transports de composés à travers la membrane plasmique en modifiant sa perméabilité. Certains auteurs suggèrent que le tween 80 intervient par l'intermédiaire de ces acides gras qui seraient incorporés dans les phospholipides membranaires ce qui entraînerait des modifications de la structure et des propriétés de la membrane plasmique. C'est le cas d'ASTHER et coll. (1987) qui font état d'une augmentation de la production de lignine-péroxydase par addition de tween 80 et plus encore

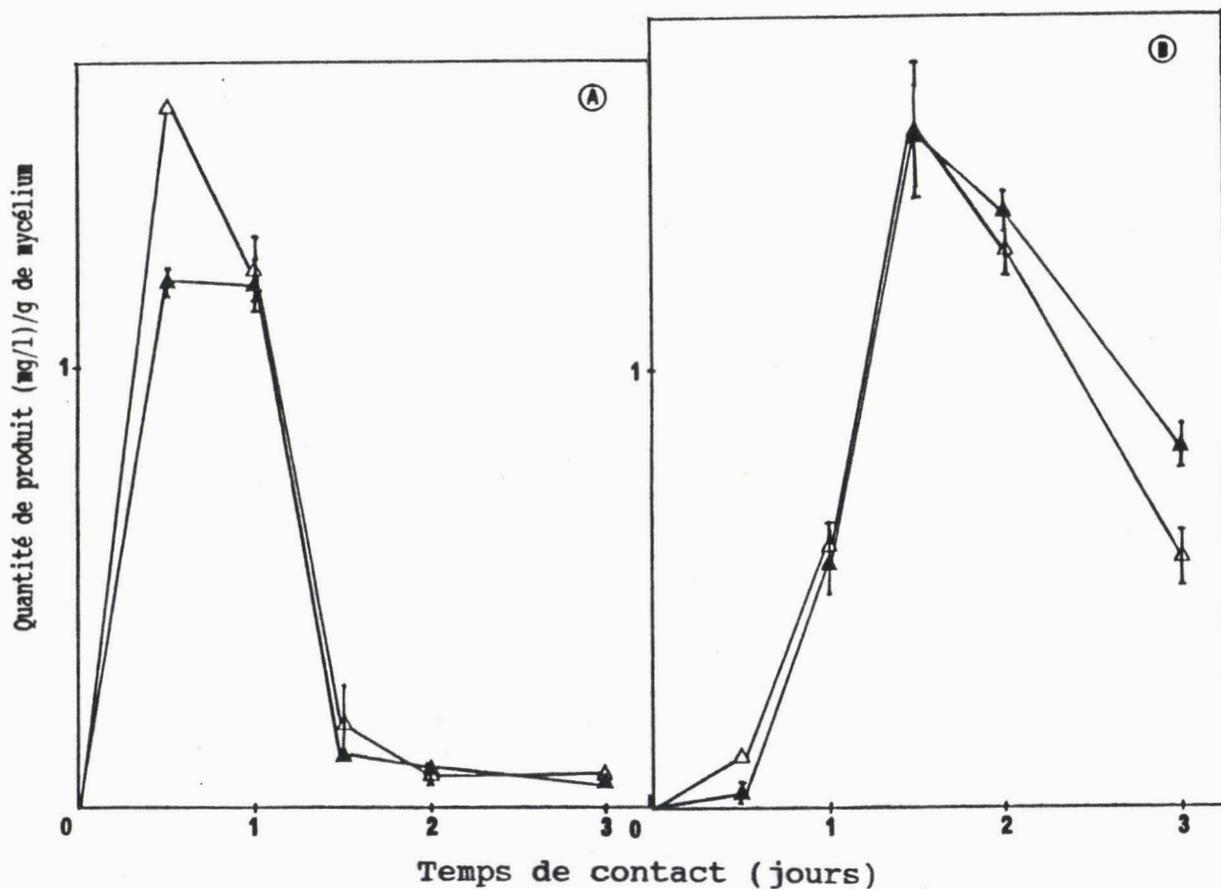


Figure VI-9 : Influence d'une addition de tween 80 à 0,05% en même temps que le substrat : évolution de la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone (A) et de la 4,4' dihydroxybenzophénone (B).

Détermination par HPLC. Incorporation du détergent : ▲—▲ = au moment de l'ensemencement (Témoin), △—△ = au moment de l'ensemencement et lors de l'addition du substrat.

d'acide oléique émulsifié avec du tween 80.

Toutefois nos résultats montrent que le CHAPS, détergent zwitterionique ne contenant pas d'acides gras, exerce, comme le tween 80, un effet positif sur la première O-déméthylation. Cette similitude de réponse entre ces deux détergents a déjà été constatée par JÄGER et coll. (1985) lors de leur étude sur la lignine-péroxydase.

3-2 : Addition de tween 80 au moment de la bioconversion

Dans l'expérience précédente nous avons constaté que le tween 80 à 0,05% accroît la vitesse initiale de la réaction mais qu'au delà de 24 heures de contact avec le substrat les quantités de produit observées sont comparables à celles du témoin. Nous avons pensé qu'après 3 jours de croissance, le tween 80 pouvait avoir été utilisé par le champignon. Aussi nous avons ajouté, en même temps que le substrat, 250 μ l de tween 80 à 10% dans chaque fiole contenant 50 ml de culture.

Dans cette étude, l'essai avec le tween 80 a été refait et sert de témoin, il est appelé "témoin-détergent". D'une expérience à l'autre les résultats sont reproductibles puisque nous retrouvons en 12 heures une concentration importante en 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone : 4,2 mg/l dans l'essai précédent et 4,5 mg/l dans le "témoin-détergent" (Figure VI-9).

Pour la 44' dihydroxybenzophénone, la concentration obtenue en 48 heures est supérieure à celle de l'essai précédent, mais elles sont du même ordre de grandeur. Un prélèvement à 36 heures ayant été effectué, nous remarquons que la concentration maximale en produit final est atteinte après 36 heures, et non 48 heures, de contact avec le substrat comme nous l'avions indiqué pour la figure VI-8. Par contre, en l'absence de détergent un prélèvement à 36 heures a été réalisé

(Figure VI-5) et le maximum est toujours situé après 48 heures de contact avec le substrat.

Au vu des résultats, il est incontestable que le tween 80 à 0,05% augmente la vitesse de transformation du substrat en ces deux produits successifs. De plus le rendement maximal de la bioconversion est meilleur d'environ 20% puisque tel est le gain de production constaté entre 48 heures et 36 heures. Il y a donc raccourcissement du temps de réaction ce qui n'est pas négligeable dans l'optique d'une optimisation.

Nous n'avons pas tracé les courbes de disparition du substrat : elles sont identiques entre elles et à celles de l'essai précédent.

En ajoutant du détergent au début de la bioconversion nous espérons conserver au delà de 24 heures, le bénéfice de l'addition initiale de tween 80 sur la concentration en 44' dihydroxybenzophénone. Or aucune action n'est enregistrée sur la production de ce composé alors que 12 heures après une telle addition, la quantité de composé intermédiaire mesurée dans la culture passe de 4,5 mg/l à 5,8 mg/l.

Cette répercussion immédiate sur la concentration en 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et l'absence d'effet sur la 44' dihydroxybenzophénone nous incite à croire que le tween favorise essentiellement les échanges des produits entre le milieu de culture et le milieu cellulaire en augmentant la perméabilité de la membrane plasmique (effet de stress). Il y aurait seulement une modification de la répartition extra et intracellulaire (ou membranaire) de ce produit, la quantité globale ne variant pas.

4 - CONCLUSION

Cette étude sur l'influence de certains facteurs

physico-chimiques a révélé qu'en conditions anaérobies la O-déméthylation ne pouvait s'effectuer d'où la nécessité d'une aération du milieu.

Cette importance de l'oxygénation a été confirmée par les essais en agitation. La bioconversion en conditions statiques est moins efficace mais nous avons aussi remarqué que la qualité de l'agitation intervient puisqu'avec deux agitateurs dont les caractéristiques diffèrent nous n'avons pas obtenu des résultats semblables.

Nous avons également montré qu'un éclaircissement en lumière blanche ou ultra-violette ne modifie en rien la cinétique de la bioconversion.

En ce qui concerne le pH, des variations entre pH 4,5 et 6,5 ne perturbent pas la O-déméthylation. Il faut atteindre des pH plus alcalins (8,5) pour voir la vitesse diminuer. Cette tolérance vis à vis du pH du milieu plaide pour un système enzymatique intracellulaire ou membranaire, or nous avons déjà émis cette hypothèse suite à l'absence de transformation du substrat par les filtrats de culture.

Nous avons aussi constaté que l'addition de détergents peut améliorer le rendement de la bioconversion de 20% et raccourcir le temps de la réaction sans doute en modifiant la perméabilité membranaire du champignon.

CHAPITRE VII

LES ACTEURS DE LA BIOCONVERSION ET LEURS CONCENTRATIONS

1 - INTRODUCTION

Nous avons d'abord étudié le champignon. La densité de l'inoculum est un facteur intervenant dans la croissance des souches mycéliennes et sur leurs productions. BARRIOS GONZALEZ et ANAYA (1987) ont mentionné les conséquences de l'âge de l'inoculum sur les taux de germination des spores d'*Aspergillus niger*. Chez ce champignon, la densité de l'inoculum peut agir à plusieurs niveaux : GALBRAITH et SMITH (1969) ont rapporté des variations dans la taille des "pellets", tandis que GONZALEZ et coll. (1987) ont constaté que la phase de latence augmente lorsque le nombre de spores diminue. Par contre, toujours pour *Aspergillus niger*, ce facteur n'intervient pas dans la production d'amylases (GOMOIU, 1987).

Nous nous sommes ensuite intéressés au substrat et à son environnement au travers d'une étude sur les influences de la nature du cosolvant et de l'addition de substrat au cours de la bioconversion. Le rôle du cosolvant est considérable

puisqu'il permet de solubiliser, donc de rendre accessible, un substrat qui est totalement insoluble en milieu aqueux. BLANK-KOBLENC et coll. (1988) ont montré qu'à de fortes concentrations, ces cosolvants sont toujours plus ou moins dénaturants vis à vis des enzymes et que pour une activité enzymatique donnée, certains sont plus adaptés que d'autres. Ces auteurs ont testé le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diméthylformamide et l'éthylène glycol. Le diméthylformamide (DMF) a été utilisé comme cosolvant du naphthalène (CERNIGLIA et GIBSON, 1978) et du biphényle (DODGE et coll., 1979) lors d'études sur la bioconversion de ces 2 composés aromatiques. CARLEY et coll. (1967) ont montré l'effet de différents cosolvants (acétone et diméthylsulfoxyde entre autres) sur la pigmentation et la croissance d'*Aspergillus niger*.

Enfin, nous avons cherché si la 44' dihydroxybenzophénone ne provoque pas une action rétroinhibitrice sur la réaction. Les réactions aboutissant à des composés aromatiques hydroxylés sont fréquemment mises en oeuvre dans des processus de détoxification. Par exemple au cours de l'hydroxylation du biphényle, COX et GOLBECK (1985) ont montré que les monohydroxybiphényles inhibent la croissance et la respiration d'*Aspergillus toxicarius* mais aussi la bioconversion du biphényle. Le 4 hydroxybiphényle étant beaucoup plus toxique que le substrat et le dérivé dihydroxylé, la quantité de 4 hydroxybiphényle accumulée est 10 fois plus faible que celle du 44'dihydroxybiphényle.

2 - LE MYCELIUM

2-1 : Influence de la densité de l'inoculum

Pour établir l'importance de ce facteur, nous avons ensemencé les cultures avec des suspensions de spores de différentes densités. Nous sommes partis d'une suspension à $2,5 \cdot 10^7$ spores/ml que nous avons dilué 10 fois, soit $2,5 \cdot 10^6$ spores/ml, puis 1000 fois, soit $2,5 \cdot 10^4$ spores/ml. La densité

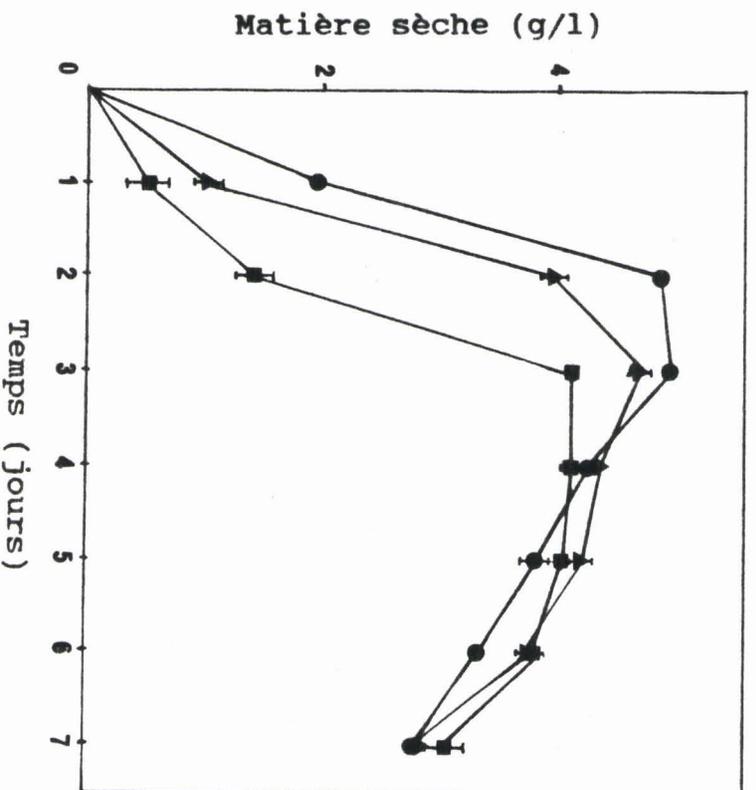


Figure VII-1 : Influence de la densité de l'inoculum sur la croissance d'*A. niger*.

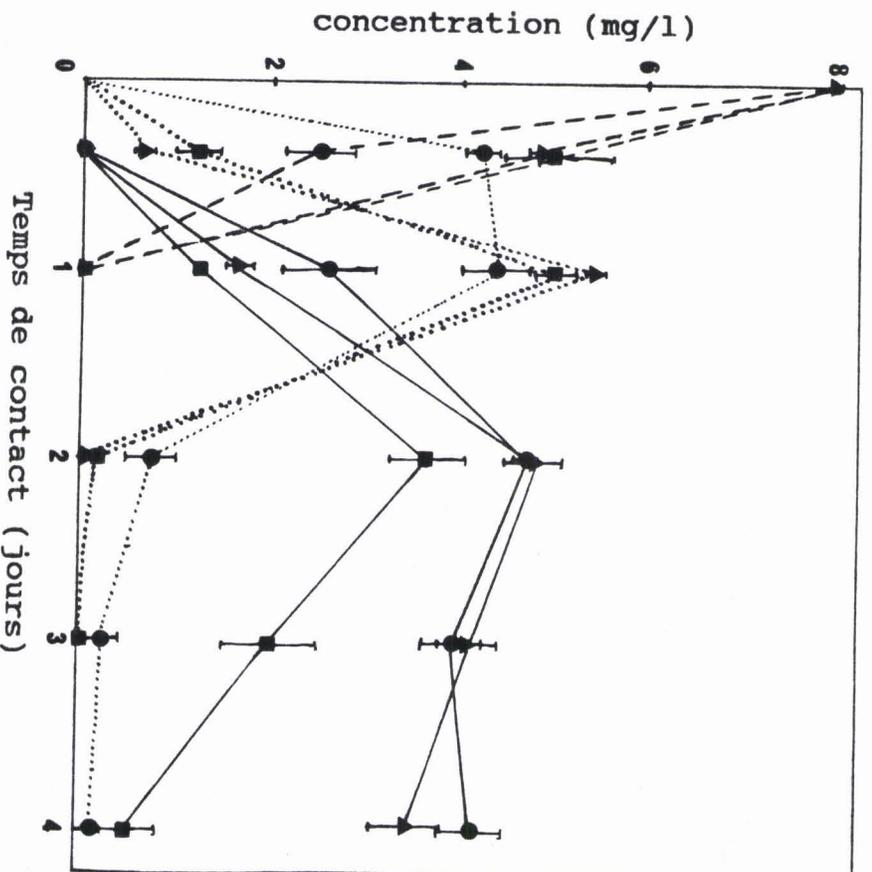


Figure VI-2 : Influence de la densité de l'inoculum sur la bioconversion.

Détermination par HPLC. Les tirets représentent le substrat, les pointillés la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et les traits pleins la 44' dihydroxybenzophénone. Densité d'inoculum :

- = $2,5 \cdot 10^7$ spores/ml, ▲ = $2,5 \cdot 10^6$ spores/ml, ■ = $2,5 \cdot 10^4$ spores/ml.

de l'inoculum n'influe pas sur la morphologie des cultures -il se forme toujours des "pellets"- mais modifie la taille de ces "pellets". Plus l'inoculum est dense, plus les "pellets" sont de petite taille. Ce résultat est en accord avec ceux de GALBRAITH et SMITH (1969) et YANAGITA et KONAGÉ (1963) : c'est une conséquence de la moindre concentration relative en éléments nutritifs par cellule.

Au cours des 2 premiers jours de culture, la vitesse de croissance est d'autant plus importante que l'inoculum est dense (Figure VII-1). Au 3ème jour, les maxima de croissance avec les 2 densités les plus élevées sont semblables. Seules les cultures ensemencées avec la suspension à $2,5 \cdot 10^4$ spores/ml présentent un maximum un peu plus bas. Ce résultat va à l'encontre de celui de GONZALEZ et coll. (1987) qui notent que la vitesse de croissance d'*Aspergillus niger* n'est pas affectée par des variations, de 10 à 10^5 , du nombre initial de spores. A contrario, SANCHOLLE (1984) a démontré qu'un inoculum plus dense accélère la croissance et fait disparaître la phase de latence de *Taphrina deformans*. De plus il a constaté que les maxima apparaissent 24 heures plus tôt dans le cas d'un ensemencement avec l'inoculum le plus concentré. Nous obtenons le même type de résultats puisque la fin de la phase exponentielle se situe au 2ème jour de culture, au lieu du 3ème jour pour les essais ensemencés avec $2,5 \cdot 10^7$ spores/ml.

Les résultats de la bioconversion sont illustrés dans la figure VII-2. Dans les cultures avec les suspensions à $2,5 \cdot 10^4$ et $2,5 \cdot 10^6$ spores/ml, les courbes de disparition du substrat et d'apparition de la 4 hydroxy-4' méthoxy-benzophénone présentent la même allure. Par contre, les quantités de produit final formées dans les cultures à faible densité d'inoculum sont plus faibles et diminuent beaucoup plus rapidement après leur maximum.

La bioconversion démarre plus vite dans les cultures où l'inoculum est le plus dense : en 9 heures il reste

moins de substrat que dans les deux autres essais et la concentration en produit intermédiaire est déjà égale à celle qui est obtenue en 24 heures : le maximum doit donc se trouver dans cet intervalle. La courbe de concentration du dérivé dihydroxylé a la même allure que celle tracée avec la culture dont l'inoculum contenait $2,5 \cdot 10^6$ spores/ml, mais entre 9 heures et 24 heures la vitesse de formation de la 44' dihydroxy-benzophénone est beaucoup plus grande. Les productivités calculées sur les premières 24 heures sont respectivement égales à 2,62 mg/l/jour et 1,63 mg/l/jour.

En présence d'un inoculum très dense les "pellets" sont très petits, donc pour un même volume de culture il y a une plus grande surface de mycélium en contact avec le substrat dissous dans le milieu. Il semble en résulter une nette augmentation de la vitesse de transformation du substrat en 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et dans une moindre mesure de la bioconversion de cette dernière en 44' dihydroxybenzophénone. L'effet est sensible entre 9 heures et 24 heures mais en 48 heures la concentration en produit final est identique dans les 2 cultures avec les densités d'inoculum les plus fortes.

2-2 : Variation du moment d'addition du substrat en fonction de la densité de l'inoculum

Dans l'essai précédent, pour la cultureensemencée avec une suspension à $2,5 \cdot 10^7$ spores /ml, nous avons constaté que le maximum de croissance est atteint en 2 jours au lieu de 3 pour la culture dont l'inoculum contient $2,5 \cdot 10^6$ spores/ml.

Nous ajoutons le substrat après 3 jours de croissance : dans le 1er cas, l'addition a lieu pendant la phase stationnaire tandis que, dans le 2ème, elle est effectuée à la fin de la phase exponentielle.

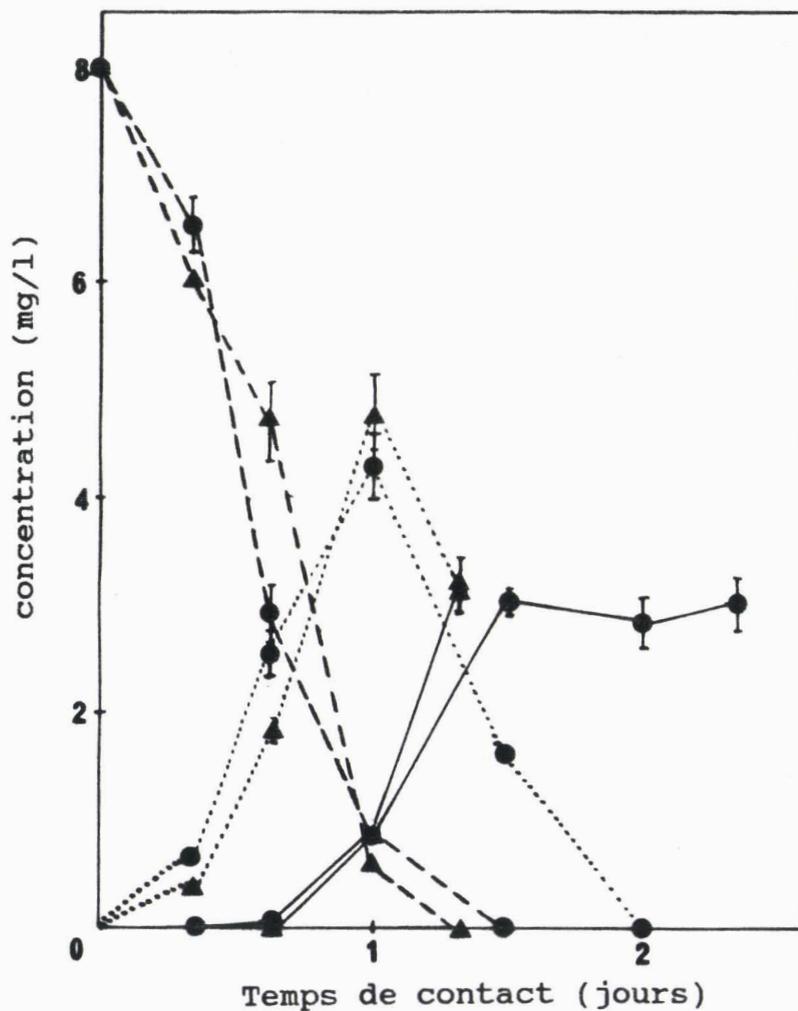


Figure VII-3 : Influence du moment d'addition du substrat sur la bioconversion en fonction de la densité d'inoculum.

Détermination par HPLC. ● = $2,5 \cdot 10^7$ spores/ml, ▲ = $2,5 \cdot 10^6$ spores/ml, - - - = substrat, — = 44' dihydroxybenzophénone, ····· = 4 hydroxy 4' méthoxy benzophénone.

Pour que les conditions soient les mêmes dans les 2 essais, nous avons ajouté la 44' diméthoxybenzophénone après 2 jours de croissance dans les fiolesensemencées avec l'inoculum le plus dense et après 3 jours de croissance dans les cultures à plus faible densité d'inoculum.

Bien que dans ce dernier cas l'expérience n'ait pu être prolongée au delà de 32 heures, nous constatons que les courbes des 2 produits de la réaction se superposent (Figure VII-3). En comparant ces courbes à celles de la figure VII-2, nous remarquons le pic de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone obtenu après 9 heures de réaction et l'écart entre les concentrations du produit final ont disparu. Le maximum du produit intermédiaire s'est décalé vers la droite pour coïncider avec celui de l'essai où l'inoculum contient 10 fois moins de spores. Quant à la disparition du substrat, les concentrations restantes en 9 heures sont identiques contrairement à l'essai précédent (Figure VII-2), mais en 15 heures elles présentent un écart qui n'est pas négligeable mais qui est toutefois plus petit que celui relevé après 9 heures de contact dans l'essai précédent.

Dans le précédent paragraphe nous avons supposé que les dissemblances de réponses résultaient d'une variation de la taille des "pellets". Grâce a cette dernière expérience nous démontrons que celle-ci n'intervient pas dans la vitesse de la bioconversion et que seul le moment d'addition du substrat agit sur cette vitesse. Ce résultat confirme ceux obtenus en chromatographie sur couche mince reportés dans le paragraphe 2 du chapitre IV.

3 - LE SUBSTRAT

3-1 : Influence de la nature du cosolvant

Dès les premiers essais, nous avons remarqué que l'acétone dissout très bien le substrat et qu'au moment de son

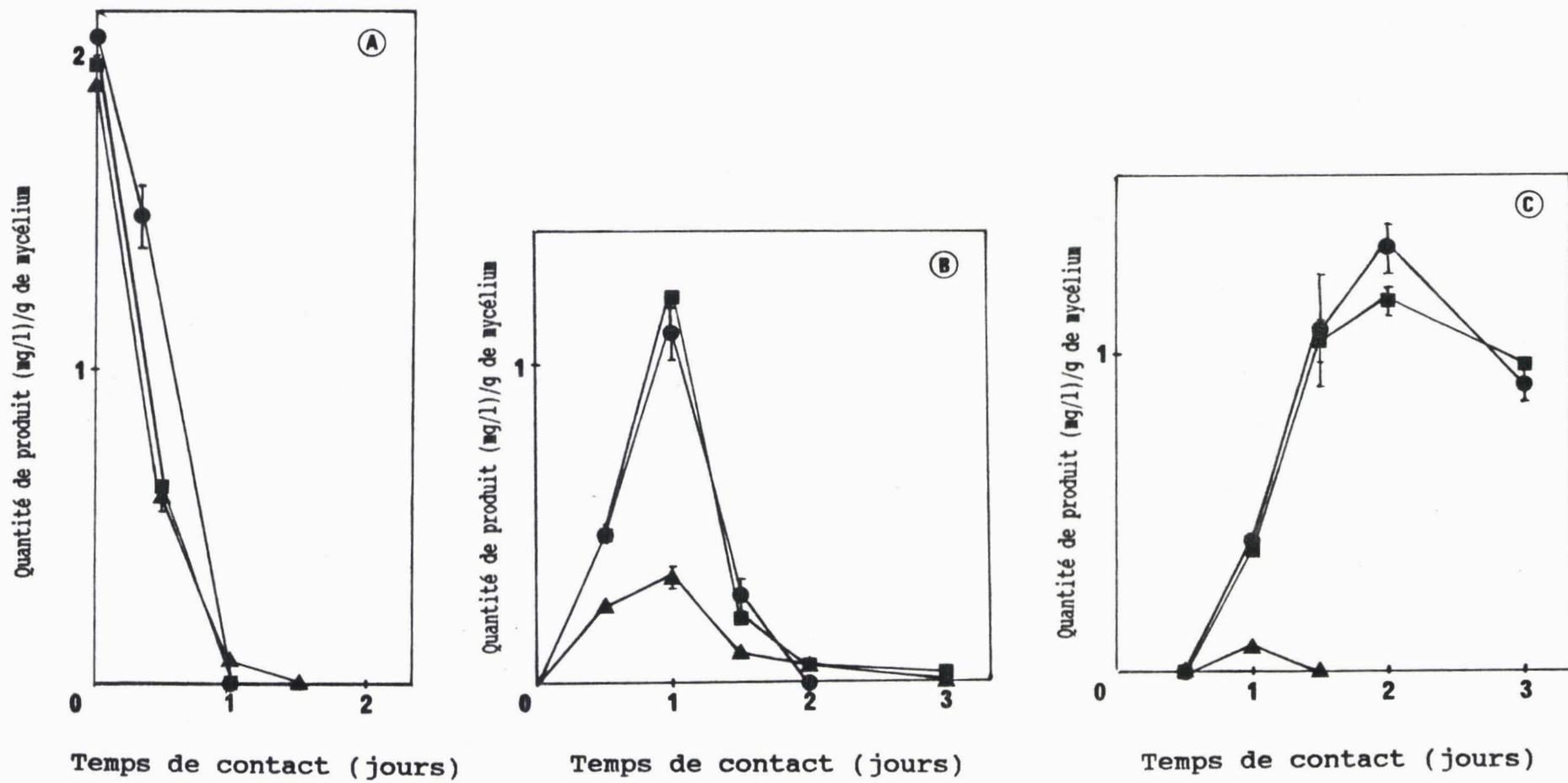


Figure VII-4 : Influence du cosolvant sur la bioconversion :
 évolution de la 44' diméthoxybenzophénone (A), de la 4 hydroxy-
 4' méthoxybenzophénone (B) et de la 44' dihydroxybenzophénone
 (C).

Détermination par HPLC. ■—■ = diméthylformamide, ▲—▲ = DMSO, ●—● = acétone.

addition elle ne gêne pas la culture. SANCHOLLE (1984) s'est également servi de l'acétone dans son étude sur les effets du propiconazole, un triazole à activité fongicide, inhibiteur de synthèse des stérols. Nous avons donc décidé d'utiliser ce solvant ; néanmoins sa capacité à dissoudre les corps gras peut laisser supposer une action sur la perméabilité de la membrane plasmique du mycélium et donc sur la bioconversion.

Dans cette étude, nous avons sélectionné deux autres solvants : le diméthylformamide (DMF), fréquemment employé pour dissoudre des composés aromatiques (CERNIGLIA et GIBSON, 1978 ; GOLBECK et COX, 1983), et le diméthylsulfoxyde (DMSO) connu pour son action perméabilisante des membranes mais non dénué de toxicité.

Le remplacement de l'acétone par le diméthylformamide n'apporte pas d'amélioration sensible de la bioconversion (Figure VII-4). Toutefois la vitesse de disparition du substrat est augmentée puisqu'en 12 heures il en reste 0,63 mg/g de mycélium contre 1,63 mg/g dans l'essai avec l'acétone. Le diméthylformamide semble donc faciliter l'entrée ou la fixation du substrat sur le mycélium.

A l'opposé, l'emploi du DMSO est un obstacle à la transformation. La courbe de formation du composé mono-O-déméthylé présente le même profil que dans l'acétone mais les quantités synthétisées sont bien plus faibles : en 12 heures elles sont divisées de moitié et l'augmentation qui suit reste très modeste. Il en résulte une absence presque totale de 44' dihydroxybenzophénone. Paradoxalement, le substrat disparaît aussi rapidement qu'avec le diméthylformamide. Pour expliquer ce phénomène nous supposons que l'action perméabilisante du DMSO a permis l'introduction de la 44' diméthoxybenzophénone dans les cellules fongiques mais qu'ensuite ce solvant a inhibé l'activité enzymatique.

Tableau VII-1 : Influence d'additions supplémentaires de substrat sur la bioconversion.

Temps t		0 j	1 j	2 j	3 j	4 j
1ère série : 1 addition de S à t = 0	Temps de contact		24 h	48 h	72 h	96 h
	Produits	addition	(+) A B	(+) B	(+) B	(+) B
2e série : 2 additions de S à t = 0 et à t = 1	Temps de contact			24 h	48 h	72 h
	Produits	addition	addition	S (+) A B	(++) A (+) B	(+) A (++) B
3e série : 3 additions de S à t = 0, t = 1 et t = 2	Temps de contact				24 h	48 h
	Produits	addition	addition	addition	(+) S (+) A B	(+) S (+) A B

Estimation à partir de CCM. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Quantité de S, A ou B : (+) = forte, (++) = très forte, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée comme moyenne.

3-2 : Influence de l'addition du substrat au cours de la bioconversion

Dans tous les essais nous avons le substrat qui disparaît en 24 heures puis en 48 heures c'est au tour du produit monohydroxylé de disparaître. En raison des problèmes de floculation, inévitables si la concentration en substrat est trop élevée, nous ne pouvons augmenter la quantité de substrat au début de la bioconversion. Cette quantité étant très faible (8 mg/l de milieu de culture), pour essayer d'enrichir le milieu en produit final nous avons fait des additions successives de substrat (Annexe VII-1).

Les résultats sont reportés dans le tableau VII-1. Comme à l'accoutumée, 24 heures après la 1ère addition de substrat, nous obtenons une grande quantité de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, et une quantité moyenne de 44' dihydroxybenzophénone tandis qu'il ne reste plus de substrat. A partir de 48 heures de contact, seule une forte quantité de produit final est observable.

Dans la 2ème série, 24 heures après la 2ème addition de substrat, les quantités des produits mono- et di-O-déméthylés sont équivalentes à celles obtenues dans la 1ère série pour un même temps de contact, mais il reste de la 44' diméthoxybenzophénone. La vitesse de bioconversion est diminuée. En effet lors d'une 1ère addition de substrat, 24 heures suffisent pour sa disparition, alors que dans ce cas il faut 48 heures pour que le substrat ajouté à la 2ème addition disparaisse. Bien que la vitesse de réaction soit diminuée, le rendement global est amélioré puisque nous obtenons, 72 heures après la 2ème addition de substrat, une quantité de produit dihydroxylé plus importante que dans la 1ère série.

Enfin dans la 3ème série, nous constatons qu'il reste une forte quantité de substrat 48 heures après la 3ème addition. La situation n'évoluant pas, la réaction de

Tableau VII-2 : Essai de rétroinhibition par addition du produit final.

Concentrations finales en B	Temps de contact		
	24 h	48 h	72 h
8 mg/l	(+) A (B)	(B)	(+) (B)
40 mg/l	(±) S (+) A (B)	(±) A (B)	(B)
120 mg/l	S (±) A (B)	(±) A (B)	(B)

Estimation à partir de CCM. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Quantité de S, A ou B : (±) = faible, (+) = forte, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée comme moyenne. La 44' dihydroxybenzophénone observée ne résulte pas de la transformation mais est apportée en même temps que le substrat. Lorsqu'il s'en forme nous l'avons signalé par un signe (+).

bioconversion paraît être inhibée puisque la quantité de produit final reste identique à celle obtenue 24 heures après une seule addition de substrat.

L'optimisation de la production des dérivés hydroxylés ne semble pas possible par cette méthode. KIRK et LORENZ (1974) avaient envisagé une telle technique pour préparer de plus grandes quantités d'un produit d'hydroxylation d'un dérivé de l'acide benzoïque, mais lors de la 2ème addition du substrat le groupement carboxylique a été réduit en alcool sans que l'hydroxylation ait lieu .

La bioconversion s'est essouffée soit parce que la culture mycélienne s'épuise, soit par un effet de rétroinhibition ou de toxicité dû au produit de la réaction. Dans le paragraphe suivant nous allons essayer d'analyser ce phénomène.

4 - LE PRODUIT FINAL

Le dérivé mono-O-déméthylé n'est pas commercialisé, nous avons donc étudié les possibilités de rétroinhibition seulement avec le composé dihydroxylé (Annexe VII-2).

Avec la solution mère la moins concentrée, nous avons 8 mg/l de 44' dihydroxybenzophénone dans le milieu de culture, ce qui correspond à peu près à la concentration finale dans le cas d'une transformation quasi totale du substrat.

Une telle concentration ne gêne pas le champignon : la totalité du substrat a disparu en 24 heures et il n'y a plus de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone en 48 heures à l'instar des essais habituels (Tableau VII-2). En 72 heures, la quantité de 44' dihydroxybenzophénone est plus abondante dans l'essai que dans le témoin "milieu" : il y a bien eu formation de ce produit.

Avec une concentration en 44' dihydroxybenzophénone de 40 mg/l, la réaction est plus lente : il reste de faibles quantités de substrat après 24 heures et de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone au bout de 48 heures d'incubation.

Avec une concentration 3 fois plus forte (120 mg/l), la bioconversion est grandement perturbée : le produit intermédiaire n'est pratiquement plus synthétisé. Néanmoins, le substrat disparaît du milieu de culture : il se fixe sur le mycélium puisqu'un bref lavage des "pellets" avec un mélange acétone-eau permet de retrouver ce substrat. Pour ces 2 dernières concentrations, l'intensité des taches chromatographiques de 44' dihydroxybenzophénone est tellement importante qu'il est impossible de déterminer s'il y a eu néoformation de ce produit pendant la bioconversion.

La vitesse de la réaction est diminuée en présence de 40 ou 120 mg/l de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, mais dans nos essais la concentration étant inférieure à 8 mg/l, le produit final n'intervient pas dans la bioconversion. Le facteur limitant est donc la solubilité du substrat et sa disponibilité pour le champignon et non pas le produit qui se forme.

5 - CONCLUSION

L'étude sur la densité de l'inoculum a montré que plus la densité est élevée, plus la vitesse de croissance est augmentée et plus la transformation de la 44' diméthoxybenzophénone est rapide. Toutefois, la croissance étant accélérée, le substrat n'est plus ajouté au même stade de la croissance si le moment d'addition n'est pas déplacée. Une fois cet ajustement opéré, les courbes de chaque produit, tracées à partir des cultures ensemencées avec $2,5 \cdot 10^6$ ou $2,5 \cdot 10^7$ spores/ml, sont en tous points semblables.

Nous avons montré que la dissolution du substrat dans l'acétone ou le diméthylformamide est sans conséquence sur la bioconversion mais qu'un solvant comme le DMSO est toxique puisque la O-déméthylation est presque totalement inhibée. La nature du solvant peut donc être un élément essentiel de la transformation.

Une addition supplémentaire de substrat, 24 heures après la 1ère addition, permet d'améliorer le rendement global de réaction puisqu'une quantité plus importante de produit final est formée, malgré une vitesse de réaction ralentie. Nous ne pouvons pas envisager d'utiliser cette technique pour accroître le rendement de 44' dihydroxybenzophénone car dès la 3ème addition de substrat la réaction semble arrêtée. Un tel phénomène ne peut s'expliquer que par un vieillissement prématuré du mycélium car, dans les conditions utilisées, aucun effet rétroinhibiteur de la 44' dihydroxybenzophénone n'a été observé.

TROISIEME PARTIE**PERSPECTIVES NOUVELLES**

Nous avons cherché à étendre le domaine d'utilisation du système étudié dans deux directions qui font l'objet des deux chapitres suivants :

Chapitre VIII : Transposition à des procédés pré-industriels

Chapitre IX : Transformation d'autres substrats

CHAPITRE VIII

TRANSPOSITION A DES PROCEDES PRE-INDUSTRIELS

1 - INTRODUCTION

Les procédés industriels font appel à des techniques spécifiques comme la fermentation. La mise en oeuvre de mycélium libre d'*Aspergillus niger* en cuves de fermentation a déjà été réalisée notamment pour produire des enzymes pectinolytiques (FRIEDRICH et coll., 1989), de la β -glucosidase (KERNS et coll., 1987) ou du gluconate de calcium à partir de poudres de maïs (BAIG, 1987).

A l'heure actuelle, l'immobilisation des cellules est souvent un préalable à toute fermentation. Les avantages des cellules immobilisées sont nombreux : possibilité d'une plus grande concentration en biomasse dans le milieu, recyclage aisé du système, durée de vie souvent prolongée et stabilité de l'activité enzymatique augmentée. SCOTT (1987) a passé en revue les techniques d'immobilisation, les applications et les réacteurs utilisés dans ce domaine. La production d'acide citrique peut être obtenue par *Aspergillus niger* immobilisé sur billes d'alginate (EIKMEIER et REHM, 1987) ou sur mousse de

polyuréthane (LEE et coll., 1989). L'immobilisation de *Penicillium urticae* dans des billes de carraghénane (DEO et GAUCHER, 1983), de *Nocardia Mediterranei* dans des fibres creuses (CHUNG et coll., 1987), de *Pleurotus ostreatus* dans une matrice de chitine (KLUGE et coll., 1982) ou l'adsorption de *Penicillium chrysogenum* sur des disques de polycarbonate (KARHOOT et coll., 1987) ont permis la production d'antibiotiques.

Des bioconversions sont également menées avec des microorganismes immobilisés dans des billes de polyacrylamide : hydroxylation de l'acide 3 indole-acétique par *Aspergillus niger* (BAKLASHOVA et coll., 1984), bioconversion de stéroïdes par des bactéries ou des levures (SILBINGER et FREEMAN, 1987).

Des réactions de dépollution font également appel à ces procédés. La décoloration des résidus de l'industrie papetière par *Coriolus versicolor* immobilisé dans de l'alginate a été proposée par LIVERNOCHE et coll. (1983) ainsi que la dénitrification de l'eau par *Micrococcus denitrificans* fixé sur du sable par KURT et coll. (1987). De même FAN et coll. (1987) décrivent la dégradation des phénols dans les eaux résiduaires par un mélange de microorganismes fixés sur des particules de charbon activé. Toutefois ces techniques sont assez peu utilisées industriellement. Ces quelques exemples démontrent qu'une grande diversité des supports, associée à une variété de formes de réacteurs, contribue à étendre les domaines d'utilisation des microorganismes immobilisés.

Enfin, de nombreux travaux ont prouvé que divers systèmes enzymatiques pouvaient fonctionner en présence de plus ou moins grandes proportions de solvants organiques. La bioconversion de la β -ionone par *Aspergillus niger* est améliorée en présence d'isooctane (SODE et coll., 1989), l'activité glucoamylase d'*Aspergillus niger* supporte l'addition de solvants comme le méthanol, l'éthanol ou le dioxanne-1,4 (NAGAMOTO et coll., 1986). De même CEEN et coll. (1987) ont montré que l'activité hydroxylasique d'*Aspergillus ochraceus*

sur la position 11 α de la progestérone tolère un certain nombre de solvants organiques. En outre des réactions catalysées par des lipases de *Pseudomonas fluorescens* (INADA et coll., 1984), de *Rhizopus arrhizus* (GANCET et GUIGNARD, 1986), d'*Aspergillus niger* (SHAW et LIAW, 1987) ou de *Botrytis cinerea* (de LABORDE de MONPEZAT, 1990) fonctionnent en milieu organique pur.

Dans ce chapitre nous avons cherché à adapter ces diverses techniques à la réaction de O-déméthylation de la 44' diméthoxybenzophénone.

2 - MISE EN OEUVRE DE MYCELIUM LIBRE

Nous avons réalisé des essais en fermenteur-colonne de type "air lift" ainsi qu'en fermenteur de 2 et 14 litres.

2-1 : Cultures en colonne

LINKO et coll. (1986) ainsi que MOO-YOUNG et coll. (1987) ont conduit des fermentations avec des "pellets" de mycélium libre dans des colonnes de type "air-lift". Dans les deux cas, l'air arrive dans la partie basse de la colonne et assure ainsi une agitation du milieu. Nous nous trouvons en présence d'un réacteur à lit fluidisé du type de celui décrit par GOMMERS et coll. (1986). GBEWONYO et WANG (1983a,b) ont montré que, dans ces conditions, une morphologie en "pellets" améliore le transfert d'oxygène grâce à une diminution de la viscosité. Cette remarque a toute son importance puisque, dans le chapitre VI, nous avons vu le rôle de l'air dans le rendement de la bioconversion.

Un tube, d'un diamètre inférieur à celui de la colonne, peut être placé à l'intérieur de celle-ci afin d'assurer la circulation du milieu de culture. En fonction de la forme de l'injecteur d'air, la circulation peut être

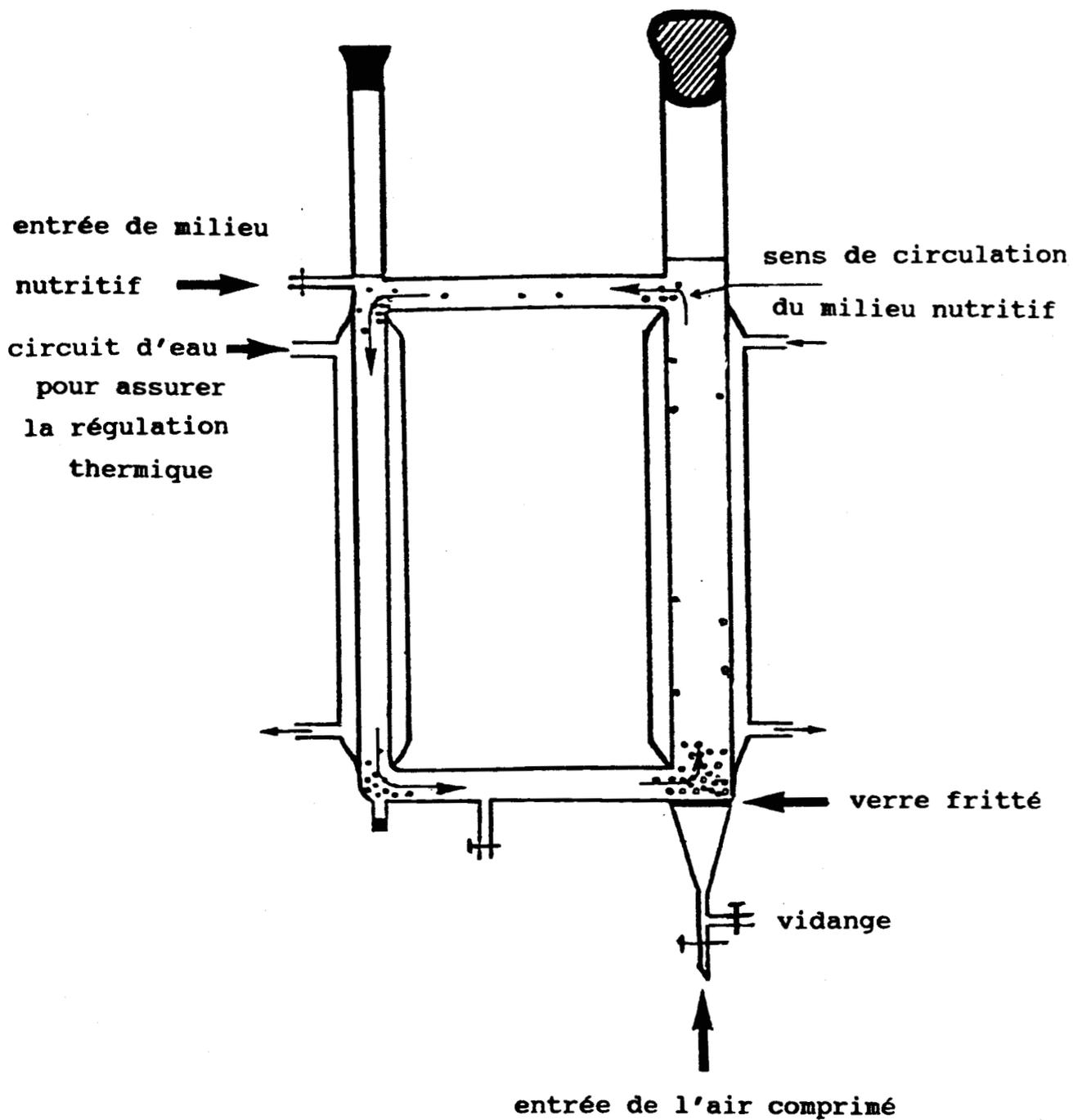


Figure VIII-1 : Fermenteur-colonne de type "air-lift".

Tableau VIII-1 : Bioconversion de la 4,4' diméthoxybenzophénone en fermenteur-colonne de type "air-lift".

Temps de contact	24 h	48 h	72 h	96 h
Produits	(+) S A B	(+) S A B	(+) S A B	(+) S A B

Estimation à partir de CCM. S = 4,4' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 4,4' dihydroxybenzophénone. Quantité de S, A ou B : (+) = forte, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée comme moyenne.

ascendante dans la zone extérieure au tube et descendante dans la zone intérieure (MOO-YOUNG et coll., 1987) ou bien inversée (KIM et coll., 1986). Nous avons préféré choisir un réacteur précédemment utilisé dans le laboratoire et dont le fonctionnement était maîtrisé. Il est constitué d'une colonne de verre en forme de U d'une contenance maximale de 1,2 litres (Figure VIII-1). L'introduction d'air se fait au travers d'une plaque en verre fritté située dans la partie basse de l'une des branches du U. La colonne est thermostatée par un manchon externe où circule de l'eau à la température voulue. Pour effectuer une vidange de la colonne, il suffit d'arrêter l'alimentation en air et d'ouvrir le robinet de vidange : les "pellets" sont retenus par la plaque de verre fritté. L'introduction du milieu neuf est réalisée par un orifice situé en haut d'une des deux branches du U.

Une préculture de 24 heures, dont les "pellets" sont déjà formés, sert à l'inoculation. Les conditions de fermentation sont reportées en annexe VIII-1.

En 24 heures nous obtenons les deux produits de transformation mais en quantités plus faibles qu'en fioles d'Erlenmeyer (Tableau VIII-1). De plus nous n'enregistrons aucune évolution au delà de 24 heures de contact.

Ce résultat peut aisément s'expliquer par la faible agitation des "pellets" qui n'est effectuée que grâce au débit d'air qui est assez faible (50 l/h). Des essais ont été tentés en augmentant ce débit mais les "pellets" ne restent plus en suspension homogène. Ils ont tendance à s'agglomérer en haut des deux branches de la colonne, aidés en cela par la trop grande formation de mousse malgré la présence d'antimousse.

Ce problème semble inhérent à ce type de fermenteur, pour approcher le même niveau de transformation qu'en fioles, nous nous sommes tournés vers un réacteur plus classique : la cuve de fermentation.

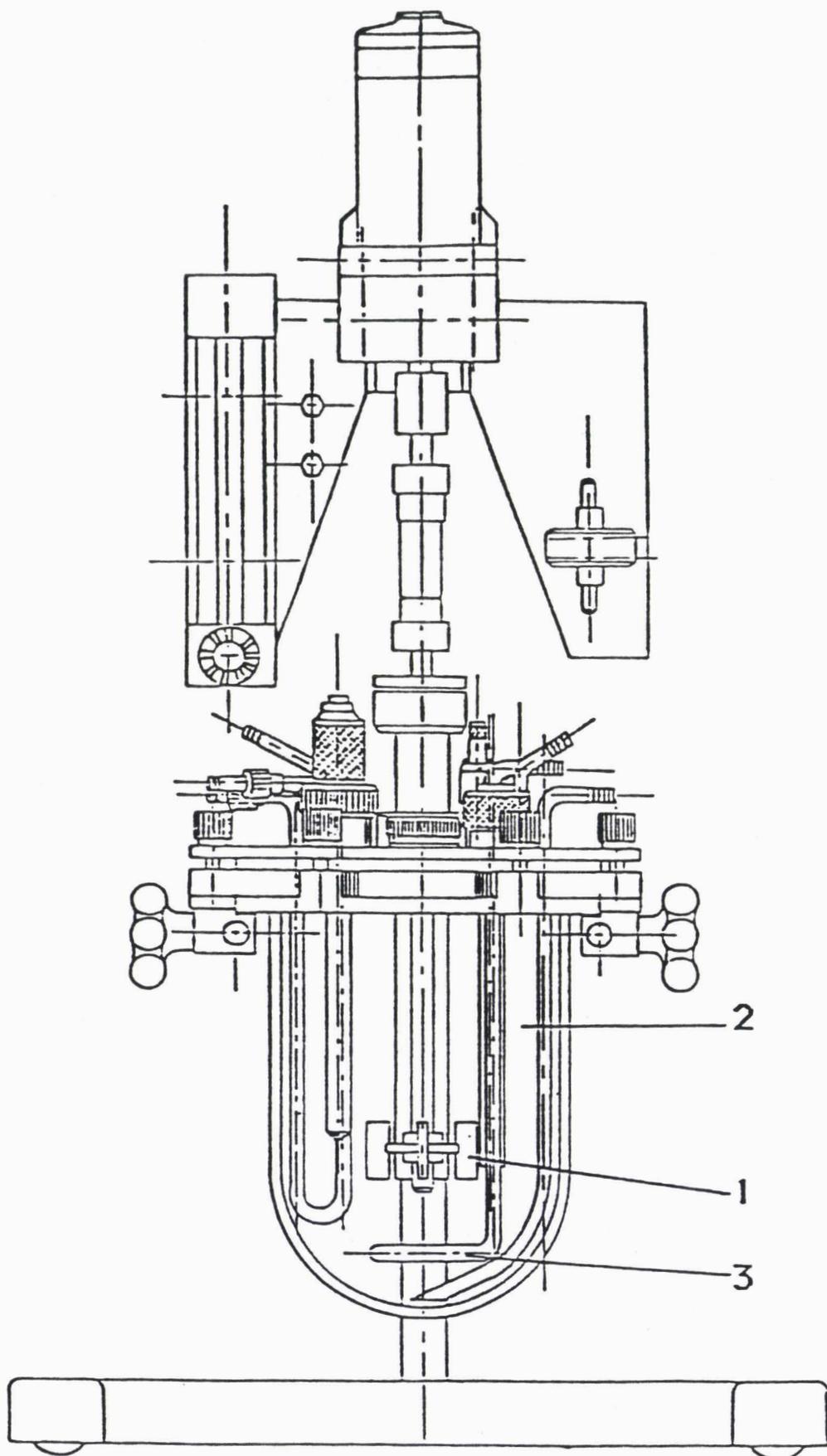


Figure VIII-2 : Fermenteur SGI type SET 2.

1 = turbine d'agitation, 2 = baffles anti-vortex, 3 = injecteur d'air.

2-2 : Cultures en fermenteur

2-2-1 : Fermenteur de 2 litres

L'appareil utilisé est un fermenteur SGI type SET 2, d'une contenance maximale de 2 litres, équipé d'un système de régulation de température et dont la vitesse d'agitation peut varier de 0 à 1000 trs/mn.

Ce réacteur (Figure VIII-2) est muni d'une turbine disque à quatre pales, de deux baffles anti-vortex, pour éviter la formation d'un cône d'agitation, et d'un injecteur d'air constitué par une bague perforée situé en fond de cuve.

Lors des premiers essais, nous avons inoculé le réacteur directement avec une suspension de spores, suivant la technique préconisée par MITARD (1987). Nous avons fait varier le volume initial du milieu (1 l ; 1,3 l ; 1,8 l), la vitesse d'agitation (200 RPM ; 300 RPM ; 500 RPM) et le débit d'air (100 l/h ; 150 l/h). Malgré ces nombreuses tentatives, le champignon s'est toujours fixé sur les baffles anti-vortex ainsi que sur les pales d'agitation. Pour éviter cela, nous avonsensemencé le fermenteur avec une préculture de petits "pellets" obtenue en 24 heures sous agitation alternative. GOMEZ et coll. (1988) ont aussi préféré cette méthode d'inoculation à l'ensemencement direct par des spores lors de leur étude sur la production d'acide citrique par *Aspergillus niger*. En effet, ils ont enregistré un meilleur rendement, qu'ils ont attribué à une plus grande homogénéité dans la forme et la taille des "pellets". Le volume de la préculture servant d'inoculum est de 150 ml, ce qui représente, suivant les recommandations de BOUIX et LEVEAU (1984), 10% du volume du fermenteur (Annexe VIII-2).

Les résultats sont reportés dans le tableau VIII-2. La bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone est réalisée sans difficulté. Les pics de production de la

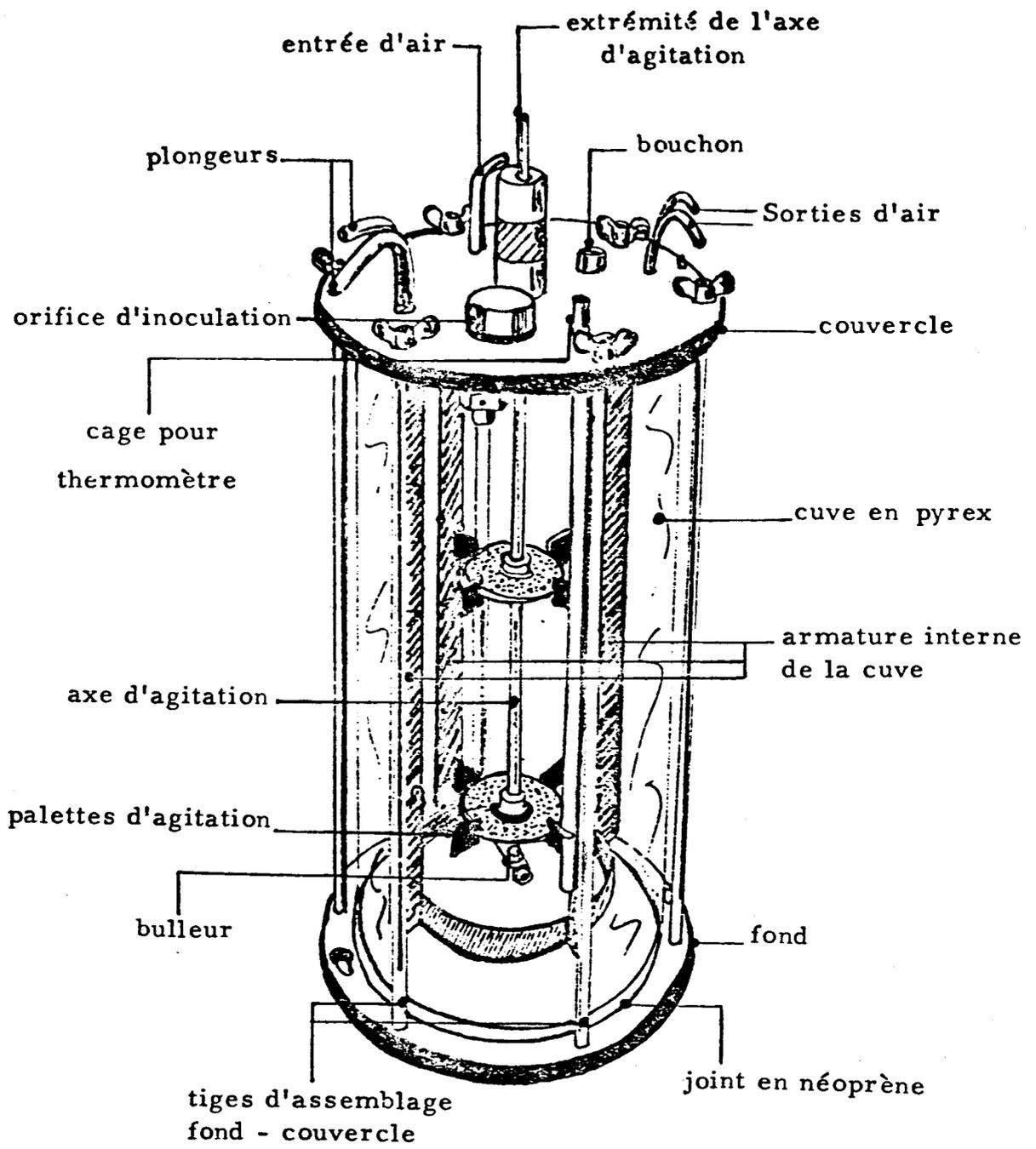


Figure VIII-3 : Fermenteur New-Brunswick CFS-314.

Tableau VIII-2 : Bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone en fermenteur de 2 litres.

Temps de contact	24 h	48 h	72 h	96 h
Produits (mg/l)				
B	1,64±0,15	4,56±0,11	4,23±0,19	4,01±0,09
A	4,82±0,06	0	0	0

A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone.

Tableau VIII-3 : Bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone en fermenteur de 14 litres.

Temps de contact	12 h	18 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Produits (mg/l)						
B	0	0,71±0,05	1,47±0,09	4,31±0,05	4,25±0,18	3,98±0,01
A	1,56±0,11	3,09±0,09	4,45±0,12	0	0	0
S	2,01±0,13	0,84±0,07	0	0	0	0

S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone.

4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et de la 44' dihydroxybenzophénone se situent respectivement à 24 heures et à 48 heures. Pour le 1er produit, la productivité, calculée sur les premières 24 heures, est de 4,82 mg/l/jour tandis que pour le second, elle atteint 1,64 mg/l/jour au bout de 24 heures et 2,28 mg/l/jour après 48 heures. Après 24 heures, nous pouvons calculer un rendement chimique qui est de 64% pour le dérivé monohydroxylé et de 23% pour le dérivé dihydroxylé. Après 48 heures, le dérivé monohydroxylé a disparu et le rendement chimique de la 44' dihydroxybenzophénone passe par un optimum de 64%. Les résultats sont équivalents à ceux enregistrés en fioles d'Erlenmeyer, nous avons donc transposé la réaction dans un fermenteur de plus grande contenance.

2-2-2 : Fermenteur de 14 litres

Le fermenteur est un New-Brunswick type CFS-314 d'un volume de 14 litres. Le contrôle de la température est réalisé par un bac thermostaté dans lequel plonge le réacteur. L'agitation est assurée par un axe portant deux hélices, réglables en hauteur, de quatre pales chacune (Figure VIII-3). Une buse d'air procure une aération correcte.

Le volume final de milieu étant de 10 litres, le volume de la préculture est de 1 litre (Annexe VIII-3). La cinétique de la bioconversion est identique à celle observée en fioles d'Erlenmeyer et en fermenteur de 2 litres : disparition du substrat et pic de production de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone en 24 heures, puis disparition de ce dernier produit et maximum de 44' dihydroxybenzophénone en 48 heures (Tableau VIII-3). La productivité maximale (au bout de 24 heures) est de 4,45 mg/l/jour pour la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone et de 2,15 mg/l/jour pour le dérivé dihydroxylé après 48 heures. Les rendements chimique après 24 heures sont respectivement égaux à 59% et à 21%. Après 48 heures, il ne reste que du dérivé dihydroxylé pour lequel le rendement est de 61%.

Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux précédemment obtenus : l'augmentation du volume de culture de 50 ml à 10 l ne modifie pas le rendement de la réaction. La transposition de cette O-déméthylation en fermenteurs de laboratoire ne pose aucun problème ; néanmoins avec ce type de réacteur en "batch", il est difficile de soutirer le milieu de culture (destiné à être extrait pour recueillir les produits), sans entraîner de mycélium. A titre d'exemple, nous pouvons citer JONES et coll. (1983) qui, malgré le piégeage du mycélium dans des billes de carraghénane, ont été contraints d'adapter, sur l'orifice de sortie de leur cuve, une grille constituée de fils d'acier inoxydable. Ce type de modification ne résout pas définitivement le problème puisqu'un risque de colmatage est toujours possible. Pour s'affranchir de ces difficultés, une des solutions consiste à immobiliser le champignon.

3 - MISE EN OEUVRE DE MYCELIUM IMMOBILISE

MALFAIT et coll. (1981) et MORESI (1981) ont montré la supériorité, au niveau du transfert d'oxygène, des réacteurs fonctionnant avec un flux ascensionnel d'air sur les réacteurs en cuve aérant le milieu par simple agitation. En outre les spores d'*Aspergillus niger* ont tendance à s'accrocher sur des surfaces de natures très diverses (KAZNACHEEV et coll., 1986). Ces résultats nous ont conduits à choisir deux réacteurs dont les arrivées d'air se font en partie basse et deux supports d'immobilisation : un en nylon et l'autre en verre.

3-1 : Immobilisation sur trame de nylon

Le réacteur utilisé est identique à celui décrit dans le paragraphe 2-1 de ce même chapitre. Une trame de nylon sur laquelle le mycélium a été préalablement immobilisé (Annexe VIII-4), est introduite dans une des deux branches verticales du réacteur. Une extrémité de cette trame est fixé dans la

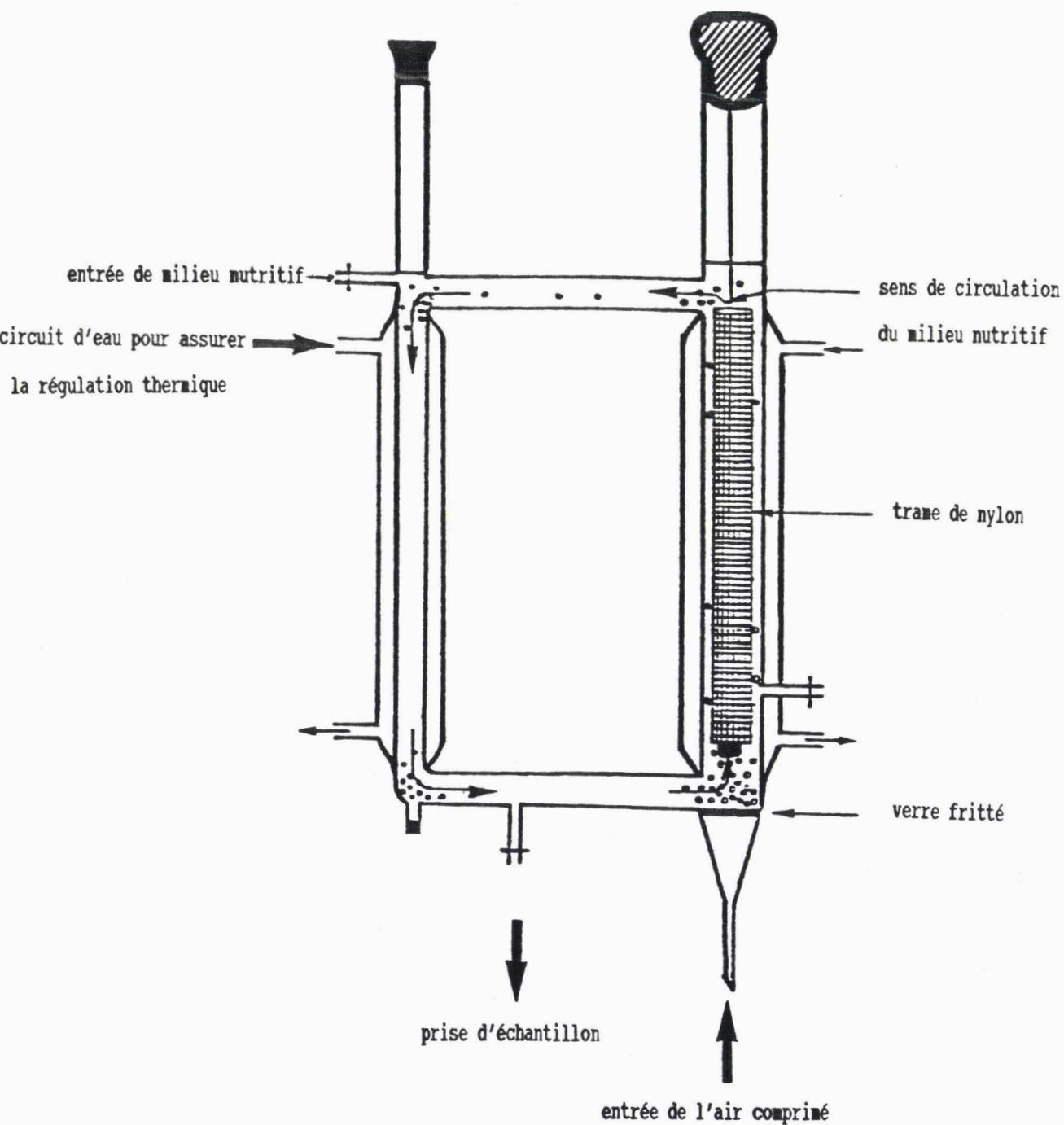


Figure VIII-4 : Fermenteur-colonne de type "air-lift" avec un support.

partie haute du réacteur et l'autre est lestée par une bille de verre afin d'assurer l'étalement complet du support malgré le flux ascendant d'air (Figure VIII-4). A tout moment, le réacteur peut être vidangé pour être alimenté par du milieu neuf.

3-1-1 : Influence du milieu

Grâce à l'immobilisation du champignon, l'opportunité nous est offerte de tenter plusieurs bioconversions successives. Avec une méthode semi-continue, KOPP et REHM (1984) puis KREN et coll. (1987) sont parvenus, avec des *Claviceps* en changeant régulièrement le milieu, à produire des alcaloïdes pendant 200 et 500 jours respectivement. Très récemment, cette technique a été utilisée par ABRAHAM et coll. (1991) pour faire synthétiser des glucoamylases à *Aspergillus niger* pendant 360 heures avec une productivité moyenne de 1400 UI/l/heures. Dans notre cas, pour mettre en oeuvre une transformation en semi-continu il suffit de soutirer le milieu contenant le produit final puis d'introduire du milieu neuf de bioconversion. Or pour conduire une opération de ce genre, il faut impérativement maîtriser la croissance du champignon. Le milieu utilisé au cours de l'immobilisation ne conviendrait pas car c'est un milieu riche et le mycélium privilégierait alors la croissance au détriment de la transformation.

3-1-1-1 : *Diminution de la concentration en glucose*

Dans un premier temps, pour limiter la croissance, nous avons seulement diminué la concentration en glucose jusqu'à 1 g/l (milieu décrit en annexe III-2). La transformation du substrat n'est pas très performante (Tableau VIII-4) : il en reste une grande quantité en 24 heures alors qu'habituellement il a totalement disparu. Toujours en

Tableau VIII-4 : Bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone avec du glucose à 1 g/l.

Temps de contact	Premier cycle				Deuxième cycle	
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h
Produits	(+) S A	(+) S A (±) B	(+) S A (±) B	(+) S A (±) B	(+) S (±) A	(+) S (±) B

Tableau VIII-5 : Bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone en l'absence de glucose.

Temps de contact	Premier cycle			Deuxième cycle				Troisième cycle	
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	96h	24h	48h
Produits	S (+)A (±)B	A B	(+)B	S (+)A (±)B	(±)S A B	(±)A B	(+)B	S (+)A (±)B	S (+)A (±)B

Estimation à partir de CCM. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Quantité de S, A ou B : (±) = faible, (+) = forte, en l'absence d'indication devant le symbole du produit, la valeur est considérée comme moyenne.

24 heures, il y a moins de produit mono-O-déméthylé et pas de 44' dihydroxybenzophénone. Il faut 48 heures pour que celle-ci apparaisse légèrement et au cours des 48 heures suivantes aucune évolution n'est enregistrée. 24 heures après le changement du milieu, la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone n'est que faiblement présente et disparaît en 48 heures. Dans le même temps le produit di-O-déméthylé est faiblement formé. Au vu de ces résultats et après avoir constaté que le mycélium continuait à se développer, nous avons mis un terme à l'expérience.

La moindre efficacité de la transformation peut résulter d'une sensibilité de la réaction à l'équilibre carbone sur azote : le rapport C/N est égal à 4 avec une concentration en glucose de 1 g/l alors qu'il est de 21 avec 10 g/l de glucose. Nous pouvons aussi supposer que le champignon donne la priorité à la croissance plutôt qu'à la transformation du substrat. Dans cette dernière hypothèse, cela signifierait que le mécanisme de la bioconversion relève du métabolisme secondaire et qu'il est donc incompatible avec une phase de croissance.

3-1-1-2 : *Elimination du glucose*

Pour éviter toute possibilité de développement mycélien, nous avons éliminé totalement le glucose du milieu précédemment utilisé. La transformation du substrat est nettement plus efficace (Tableau VIII-5) : les produits apparaissent en plus grande quantité et le substrat disparaît en 48 heures. Dans cette expérience, le rapport C/N est encore plus faible : il est égal à 1,7 or la transformation est meilleure, cela confirme donc l'hypothèse selon laquelle la réaction de bioconversion découlerait du métabolisme secondaire. Le champignon doit avoir terminé sa croissance pour que la O-déméthylation soit optimale. Néanmoins il n'est pas envisageable d'alimenter le réacteur avec un tel milieu de bioconversion car dès le 3ème cycle le mycélium se détache de

la trame et se désagrège dans le milieu. Ce phénomène est très certainement le résultat d'une autolyse des cellules mycéliennes qui ne peuvent plus assurer leur métabolisme minimum. Ce milieu ne permet donc pas la survie du mycélium.

3-1-1-3 : Milieu pauvre

Nous avons préparé un milieu, appelé "milieu pauvre", dont les constituants sont en faible concentration. Il a été élaboré en diluant au dixième le milieu de croissance à l'exception de la concentration en glucose qui est divisée par 20 soit 0,5 g/l (Annexe VIII-5). Les conditions sont décrites en annexe VIII-4. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince. Cette méthode est suffisamment sensible pour apprécier directement les quantités de produits formées. L'analyse de certains de ces essais ayant parallèlement été réalisée en HPLC, nous avons constaté l'existence d'une relation entre les intensités de fluorescence des taches chromatographiques et les rendements en produits. Ces correspondances sont données dans le tableau VIII-6.

Tableau VIII-6 : Relation entre l'intensité de fluorescence et le rendement.

Intensité de fluorescence	0,5	1	2	3	4
Rendement (%)	≤5	10±5	25±5	45±5	60±5

Chaque cycle dure 3 ou 4 jours au bout desquels le milieu est changé. Nous avons ainsi réalisé 19 cycles successifs (Figure VIII-5).

Au cours des 4 premiers cycles, la réaction évolue de la même façon : en 24 heures le rendement estimé en composé

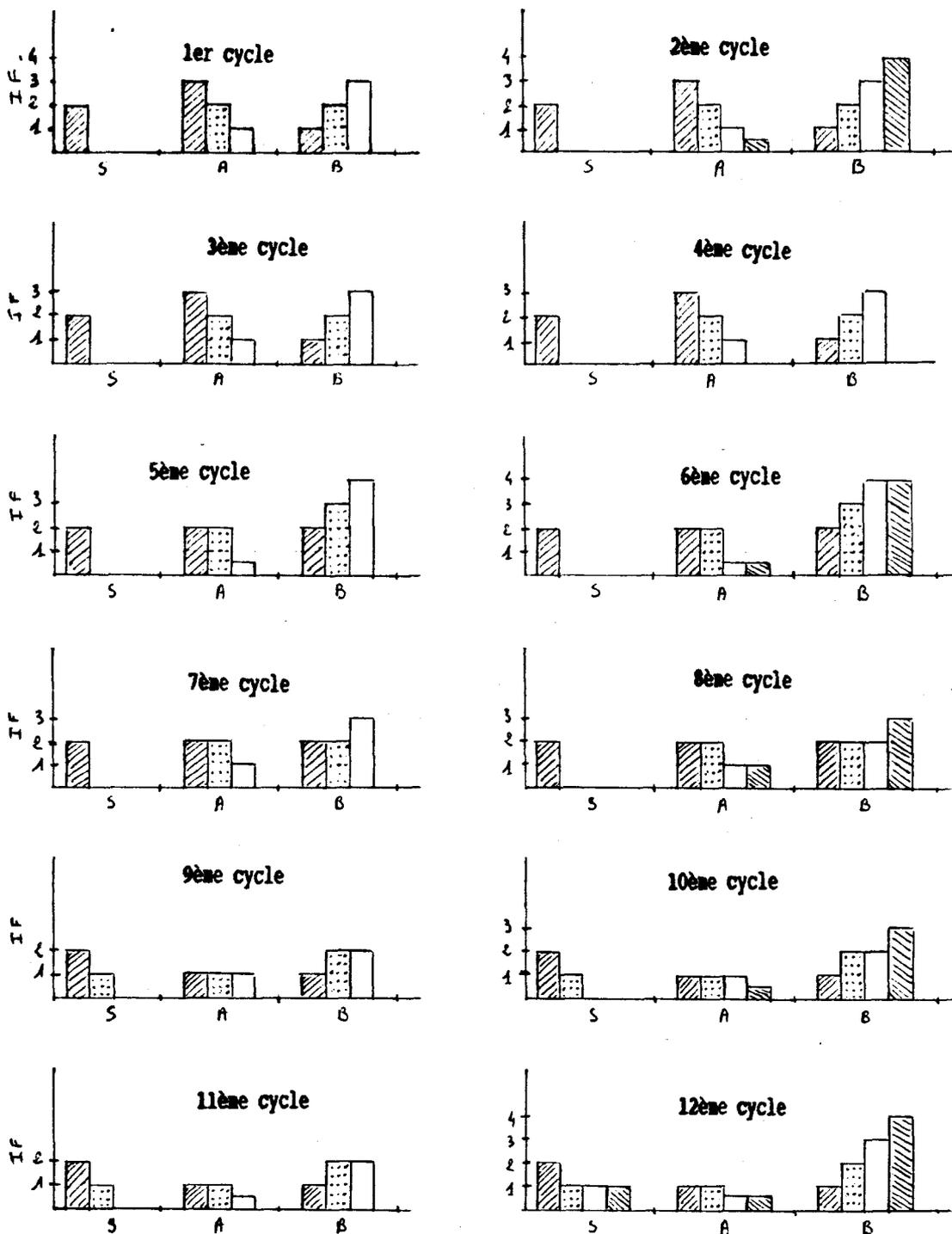


Figure VIII-5 : Bioconversion en semi-continu du substrat à 8 mg/l avec *Aspergillus niger* immobilisé sur trame de nylon.

Chaque début de cycle indique le remplacement du milieu. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Temps de contact : = 1 jour, = 2 jours, = 3 jours, = 4 jours. Le rendement est estimé à partir de l'intensité de fluorescence (IF) sur CCM : 0,55%, 1 = 10% (±5%), 2 = 25% (±5%), 3 = 45% (±5%), 4 = 60% (±5%).

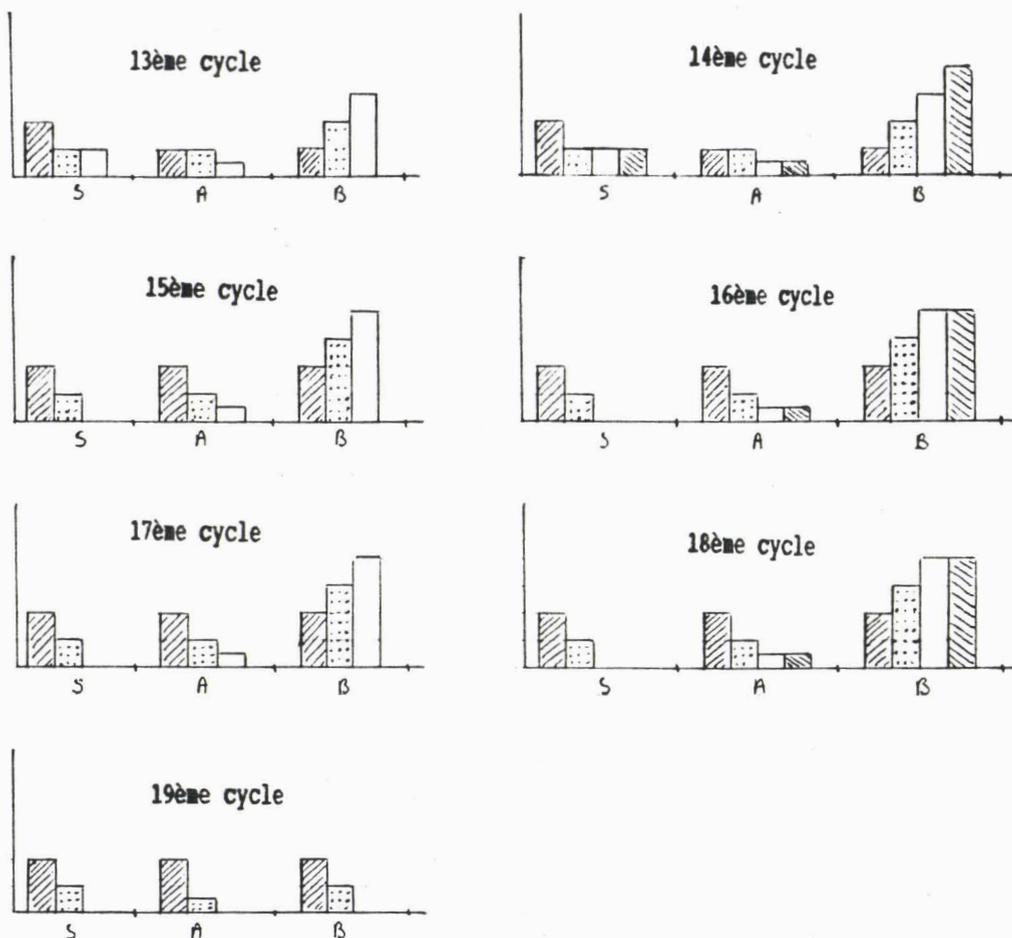


Figure VIII-5 : Bioconversion en semi-continu du substrat à 8 mg/l avec *Aspergillus niger* immobilisé sur trame de nylon.

Chaque début de cycle indique le remplacement du milieu. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Temps de contact : ▨ = 1 jour, ▤ = 2 jours, ▥ = 3 jours, ▧ = 4 jours. Le rendement est estimé à partir de l'intensité de fluorescence (IF) sur CCM : 0,5<5%, 1 = 10% (±5%), 2 = 25% (±5%), 3 = 45% (±5%), 4 = 60% (±5%).

mono-O-déméthylé est d'environ 45% et celui de la 44' dihydroxybenzophénone est proche de 10%. La transformation se poursuivant, les pourcentages respectifs de ces deux produits s'inversent au bout de 72 heures.

Aux 5ème et 6ème cycles, la réaction est plus rapide puisque la valeur maximale de 44' dihydroxybenzophénone est atteinte en 72 heures alors qu'il fallait 96 heures dans les quatre premiers cycles. Cette meilleure efficacité est probablement la conséquence d'une adaptation du mycélium aux conditions de transformation qui lui ont été imposées. Malgré ce progrès sensible, la réaction en fioles d'Erlenmeyer reste plus performante : le substrat disparaissait en 24 heures alors qu'en 48 heures le produit intermédiaire n'était plus détecté et le dérivé dihydroxylé atteignait son maximum.

L'amélioration observée pour les 5ème et 6ème cycles est de courte durée : dans les 7ème et 8ème cycles nous retrouvons les niveaux de production des quatre premiers cycles.

Ensuite, du 9ème au 14ème cycle, la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone n'est pratiquement plus détectée dans le milieu, mais le produit final est toujours synthétisé. Toutefois, il faut signaler que du 9ème au 11ème cycle, la production est diminuée puisque le rendement optimum en 44' dihydroxybenzophénone n'est plus estimé qu'à 45% au lieu de 60% .

Durant le 8ème cycle, il apparaît sur la trame, de couleur grisâtre, des zones blanches plus ou moins arrondies de 3 ou 4 mm de diamètre qui traduisent une reprise de croissance du champignon. Ces zones s'agrandissent pour presque confluer au cours du 14ème cycle. Le développement de cette nouvelle couche mycélienne mobilise la "machinerie cellulaire" du champignon et peut expliquer la moindre efficacité de la transformation : il y aurait donc inversion partielle du métabolisme. Enfin à partir du 15ème cycle, la croissance

secondaire étant terminée, nous retrouvons la même efficacité qu'aux 5ème et 6ème cycles c'est-à-dire un rendement en 44' dihydroxybenzophénone estimé à environ 60% en 3 jours de réaction. L'expérience a été arrêtée au 19ème cycle après que le mycélium se soit désagrégé dans le milieu.

Aspergillus niger immobilisé sur trame de nylon a conservé ses capacités O-déméthylantes, mais la réaction est moins efficace qu'en fioles d'Erlenmeyer ou en cuves avec du mycélium libre. En effet, même au cours des cycles les plus efficaces, le rendement optimum estimé est d'environ 60% comme dans les essais en fioles ou en cuves de fermenteur, mais il est obtenu en 72 heures au lieu de 48 heures. La productivité optimale est donc estimée, sur les premières 72 heures, à 1,40 mg/l/jour alors qu'elle est égale à 2,30 mg/l/jour pour les essais en fioles. Toutefois grâce à cette technique en semi-continu, le même mycélium a transformé du substrat pendant plus de 60 jours. Pour une même charge de mycélium, la production cumulée du composé dihydroxylé est donc très largement supérieure à celle qui a été enregistrée avec du mycélium libre. Le rendement moyen en 44' dihydroxybenzophénone estimé sur toute la durée de la bioconversion est de 42%. En 19 cycles, la production totale de ce composé est donc proche de 65 mg et la productivité moyenne, sur 64 jours, avoisine donc 1,02 mg/l/jour.

ABRAHAM et coll. (1991) ont obtenu des résultats similaires puisque l'activité glucoamylasique d'*Aspergillus niger* immobilisé est de 15 à 20% plus faible qu'avec le mycélium libre, mais le réacteur, fonctionnant en semi-continu pendant 360 heures, voit sa production totale améliorée.

3-1-2 : Augmentation de la concentration en substrat

Afin d'accroître, en valeur absolue, la production du composé final, nous avons mis une plus grande quantité de

Tableau VIII-7 : Bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone à 200 mg/l.

Temps de contact	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	5 jours	6 jours
Produits (mg/l)						
B	3,95±0,11	8,02±0,15	13,99±0,38	16,61±1,31	18,87±1,97	21,26±1,81
A	11,03±0,17	13,27±0,74	12,55±0,81	8,64±0,96	8,01±1,24	6,01±0,08
S	1,53±0,01	0,96±0,41	1,40±0,19	0,84±0,20	0,90±0,17	1,02±0,14

S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone.

substrat en contact avec le mycélium. La mise en oeuvre de l'expérience reste identique (Annexe VIII-4) mais le substrat est ajouté à la concentration de 200 mg/l. Les résultats sont illustrés par la figure VIII-6. Les essais du 1er cycle ont été conjointement analysés en CCM et en HPLC. Les résultats obtenus en HPLC sont donnés dans le tableau VIII-7.

Nous constatons que la concentration en 44' dihydroxybenzophénone augmente régulièrement tandis que le maximum de concentration de la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone est atteint en 48 heures. Ceci correspond à l'établissement d'un nouvel état stationnaire caractérisé par l'égalité des vitesses de production et de disparition de l'intermédiaire mono-hydroxylé. Le déroulement de la réaction est semblable à celui observé en fioles ou en cuves de fermentation mais le pic du produit intermédiaire est décalé de 24 heures et la quantité de produit dihydroxylé continue à s'accroître jusqu'au 6ème jour. Contrairement à l'expérience précédente une part plus importante de substrat et de produit intermédiaire persistent après 6 jours de réaction. Un essai mené en parallèle a montré que le composé intermédiaire n'est plus visible vers le 11ème jour : il est transformé en produit dihydroxylé. Après 18 jours de réaction il reste du substrat alors que la O-déméthylation est manifestement arrêtée depuis le 11ème jour. Il y a donc un excès de substrat ce qui introduit une notion de saturation ou de concentration limite pour le champignon. La productivité, calculée sur les 6 premiers jours, est égale à 3,54 mg/l/jour alors qu'en fioles elle est seulement de 2,30 mg/l/jour (au bout de 48 heures). Mais le rendement est beaucoup plus faible : 12% au bout de 6 jours au lieu de 60% après 2 jours en fioles. Nous avons remarqué que l'intensité des taches chromatographiques est proportionnelle aux quantités de produits déterminées par HPLC. Dans les cycles suivants, pour quantifier les résultats obtenus, nous avons établi une correspondance entre ces 2 types de résultats.

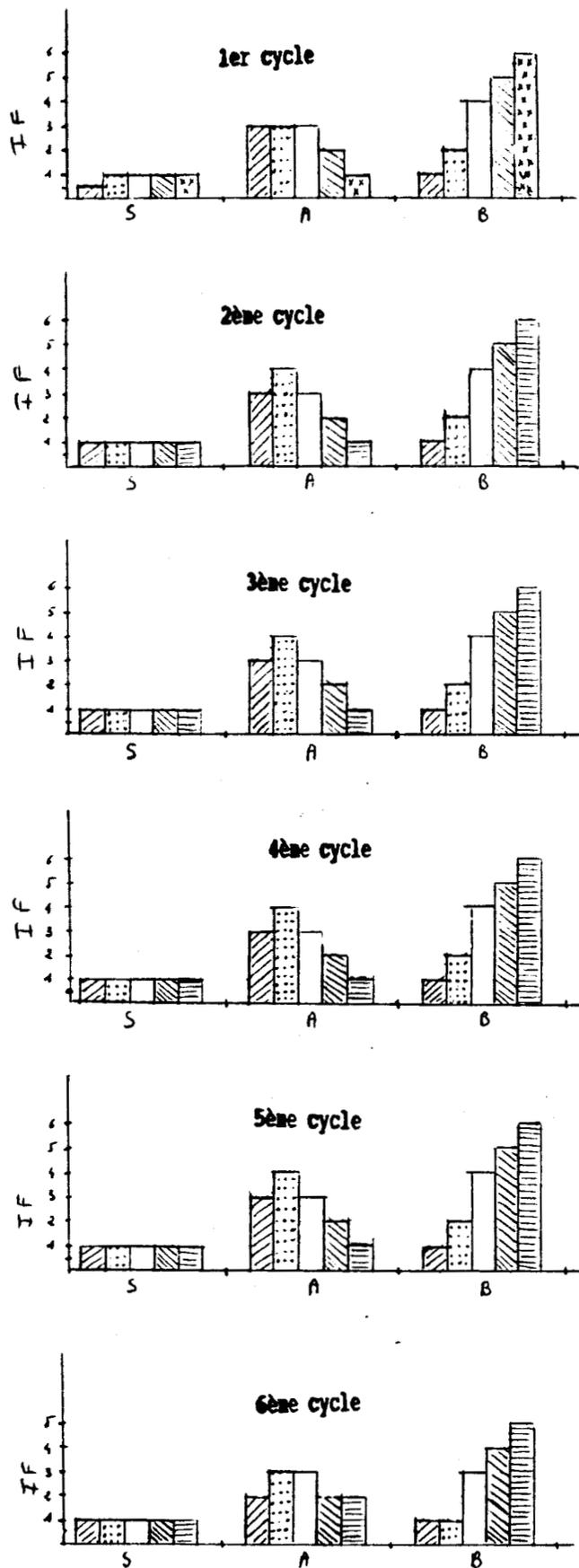


Figure VIII-6 : Bioconversion en semi-continu du substrat à 200 mg/l avec *Aspergillus niger* immobilisé sur trame de nylon.

Chaque début de cycle indique le remplacement du milieu. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Temps de contact : = 1 jour, = 2 jours, = 3 jours, = 4 jours, = 5 jours, = 6 jours, = 7 jours, = 8 jours, / = prélèvement non effectué. La production (en mg/l) est estimée à partir de l'intensité de fluorescence (IF) sur CCM : 1=5, 2 = 8 (±1,5), 3 = 11 (±1,5), 4 = 14 (±1,5), 5 = 17 (±1,5), 6 = 20 (±1,5).

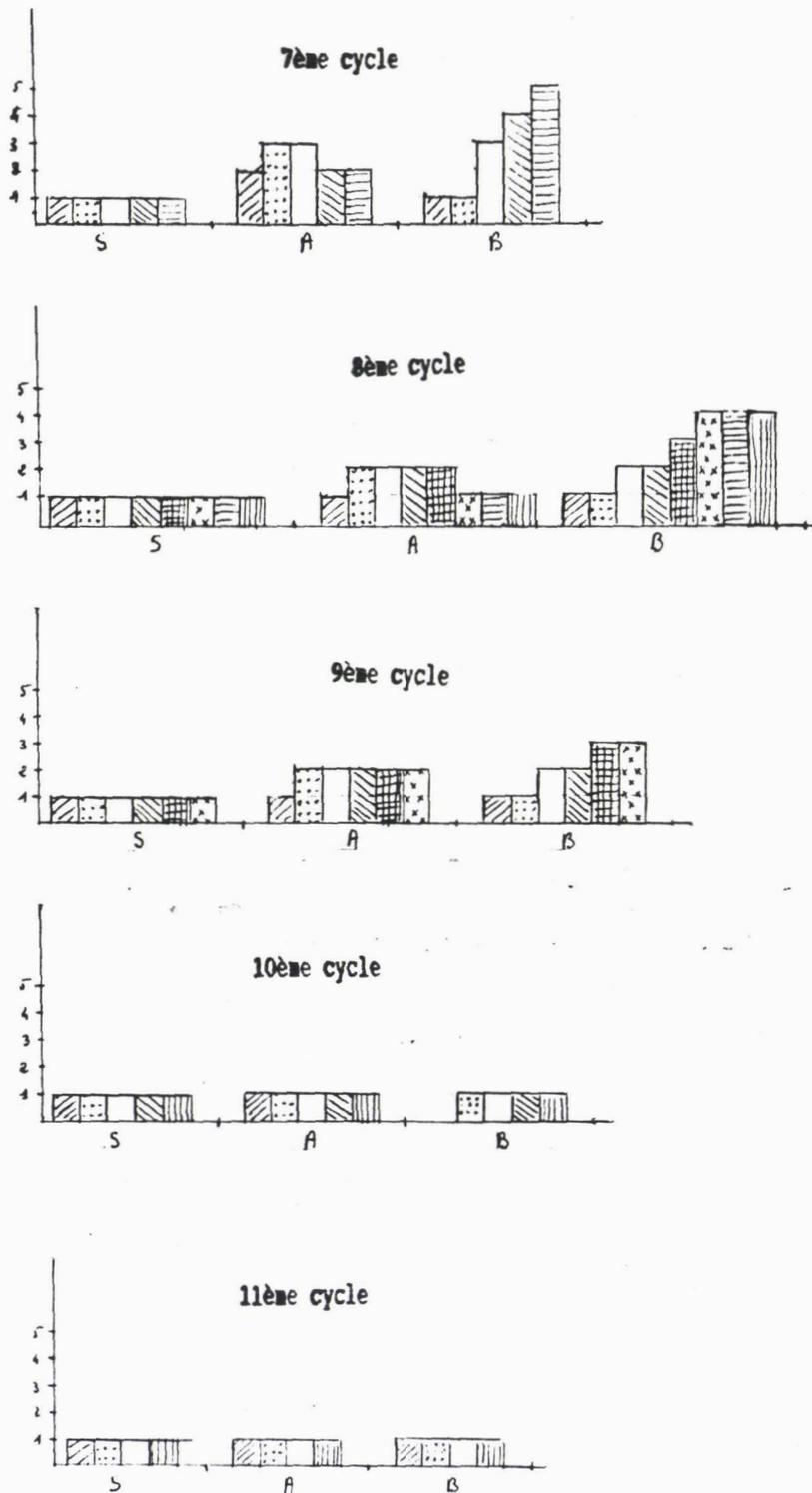


Figure VIII-6 : Bioconversion en semi-continu du substrat à 200 mg/l avec *Aspergillus niger* immobilisé sur trame de nylon.

Chaque début de cycle indique le remplacement du milieu. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Temps de contact : = 1 jour, = 2 jours, = 3 jours, = 4 jours, = 5 jours, = 6 jours, = 7 jours, = 8 jours, / = prélèvement non effectué. Le production (en mg/l) est estimée à partir de l'intensité de fluorescence (IF) sur CCM : 1 = 5, 2 = 8 ($\pm 1,5$), 3 = 11 ($\pm 1,5$), 4 = 14 ($\pm 1,5$), 5 = 17 ($\pm 1,5$), 6 = 20 ($\pm 1,5$).

Tableau VIII-8 : Relation entre l'intensité de fluorescence et le rendement.

intensité de fluorescence	1	2	3	4	5	6
produit (mg/l)	5	8±1,5	11±1,5	14±1,5	17±1,5	20±1,5

Au cours des 4 cycles suivants, la réaction évolue de façon strictement identique.

Du 6ème au 9ème cycles, la vitesse de réaction décroît régulièrement. Au 10ème cycle un début de transformation a lieu mais la réaction n'évolue plus au delà de 48 heures de contact avec le substrat.

Grâce à cette augmentation de la concentration en substrat et malgré un rendement moyen faible (environ 8% sur toute la durée de la bioconversion), la production de 44' dihydroxybenzophénone est très nettement renforcée. En effet, la quantité globale, estimée à partir du tableau de correspondance, avoisine 170 mg : c'est plus de 2,5 fois plus que dans les essais précédents. La durée totale de l'expérience est de 78 jours, la productivité moyenne estimée est donc proche de 2,20 mg/l/jour, identique à celle obtenue en fioles.

Grâce à ces techniques d'immobilisation sur trame de nylon et culture en semi-continu, nous avons démontré que notre souche d'*Aspergillus niger* était capable de réaliser la O-déméthylation de la 44' diméthoxybenzophénone dans un système adaptable industriellement. Une étude pourrait être entreprise en vue d'améliorer les rendements : étant donné le rôle de l'oxygène, des variations dans le débit d'air pourraient entraîner des modifications sensibles du taux de bioconversion. De la même manière, l'optimisation du milieu de bioconversion, la recherche de la concentration optimale en substrat ou le

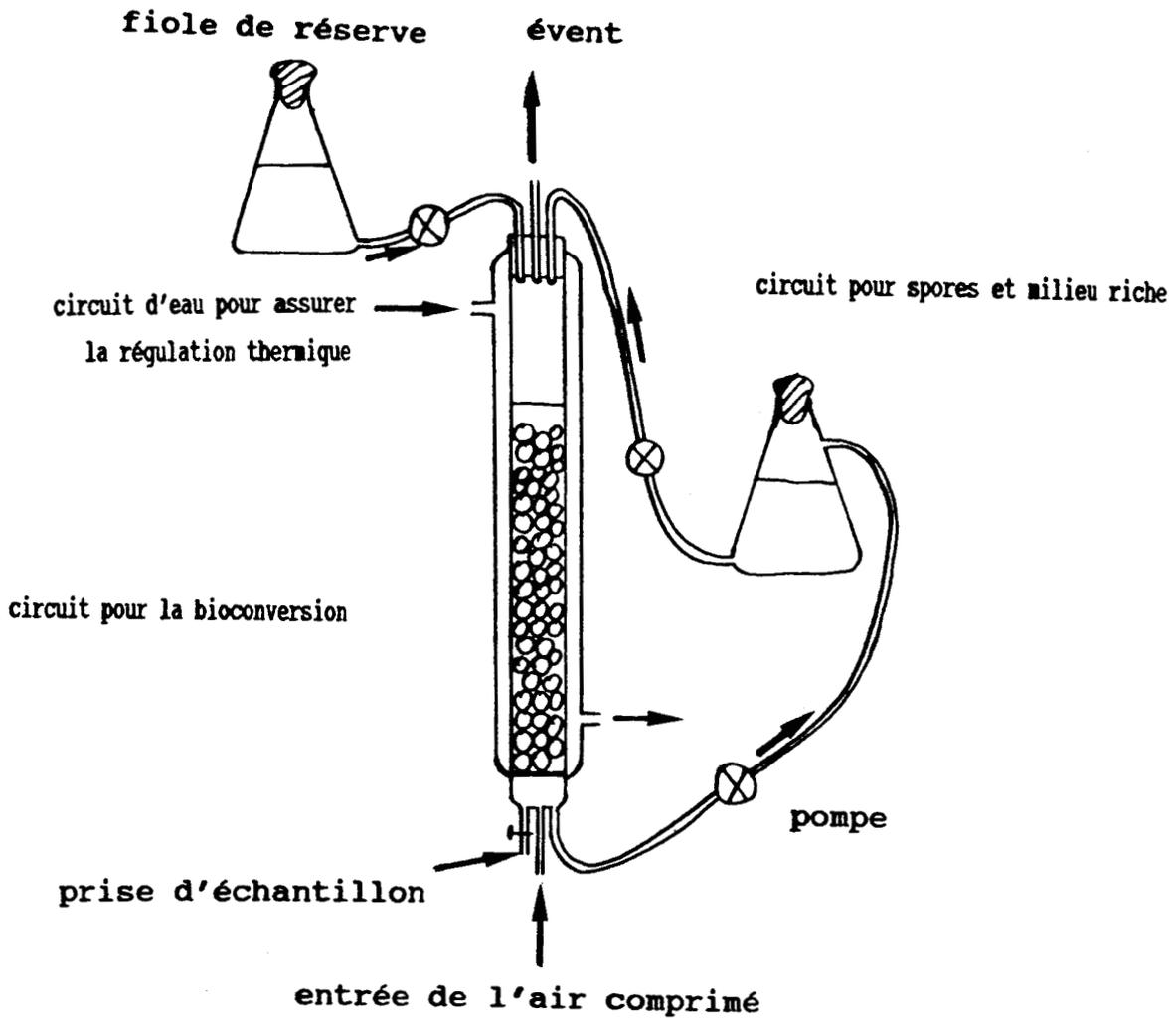


Figure VIII-7 : Fermenteur-colonne avec anneaux de Raschig.

fractionnement de l'alimentation en ce même substrat pourraient être envisagés. Ces deux expériences avaient pour but d'établir si la réaction de transformation était possible en réacteurs pré-industriels et de fixer les conditions "minimales" qui permettent le déroulement de cette transformation.

3-2 : Immobilisation sur anneaux de Raschig

En dépit des résultats enregistrés, le réacteur utilisé pour l'expérimentation décrite dans le paragraphe précédent présente 2 inconvénients majeurs dans l'optique d'une application industrielle : sa conception en double branche limite ses dimensions et donc le volume disponible ; le recours à une trame oblige à transférer cette dernière dans le réacteur après le début de la croissance ce qui entraîne des risques de contamination. Notre choix s'est donc porté sur une colonne simple qui constitue le type de réacteur le plus classiquement employé.

3-2-1 : Mise en oeuvre

Le support constitué par des anneaux de verre appelés anneaux de Raschig, a été retenu pour son incompressibilité ce qui limitera les problèmes de colmatage. Pour les mêmes raisons, PARASCANDOLA et coll., (1987) avaient choisi des granules de tuf, tandis que TOLDRA et coll. (1986) avaient aussi adopté un support en verre constitué de fibres de verre poreuses placées parallèlement dans une colonne.

Nous avons raccordé la colonne à 2 circuits distincts, l'un pour l'immobilisation des spores et la croissance en milieu riche, l'autre pour la transformation du substrat (Figure VIII-7). En doublant les circuits nous évitons le risque de colmatage des tuyaux par la croissance de spores accrochées aux parois. En outre la bioconversion ne serait plus le fait exclusif du mycélium fixé sur les anneaux de Raschig.

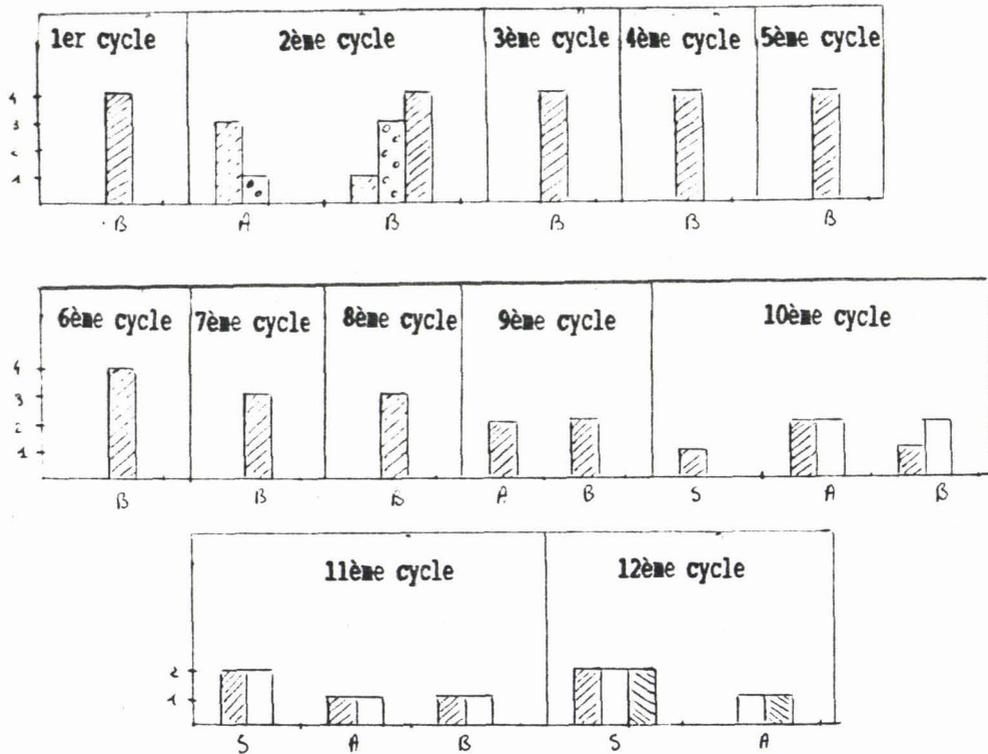


Figure VIII-8 : Bioconversion en semi-continu du substrat à 8 mg/l avec *Aspergillus niger* immobilisé sur anneaux de Raschig.

Chaque début de cycle indique le remplacement du milieu. S = 44' diméthoxybenzophénone, A = 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone, B = 44' dihydroxybenzophénone. Temps de contact : ▨ = 6 heures, ▩ = 18 heures, ▧ = 1 jour, □ = 3 jours, ▦ = 4 jours. Le rendement est estimé à partir de l'intensité de fluorescence (IF) sur CCM : 0,5 ≤ 5%, 1 = 10% (±5%), 2 = 25% (±5%), 3 = 45% (±5%), 4 = 60% (±5%).

Enfin, le circuit réservé à la transformation ne risquant pas de se colmater, nous pouvons utiliser des tuyaux de plus faible diamètre qui permettent de ralentir le débit du milieu de bioconversion.

Les conditions expérimentales sont données en annexe VIII-6. Dans cet essai de bioconversion en discontinu, le mycélium transforme le substrat présent dans le volume de la colonne. Lorsque la totalité de ce substrat a été O-déméthylée, la colonne est vidée dans une fiole de récupération puis remplie avec un volume identique de milieu neuf venant de la fiole de réserve. Les résultats pourront être comparés avec ceux obtenus lors de l'immobilisation sur trame de nylon.

3-2-2 : Analyse commentée des résultats

Etant dans les mêmes conditions de concentration que dans les essais avec la trame de nylon, nous avons adopté les mêmes équivalences entre les intensités de fluorescence et les rendements (Tableau VIII-6).

Dans le premier cycle, en 24 heures, il n'y a que du produit dihydroxylé en très forte proportion (Figure VIII-8). Dans le 2ème cycle nous avons fait des prélèvements après 6 heures et 18 heures de contact avec le substrat pour suivre l'évolution de la bioconversion. En 6 heures le rendement en dérivé mono-O-déméthylé est de 45%, celui de la 44' dihydroxy-benzophénone est de 10% tandis que le substrat a totalement disparu. La transformation se poursuivant, en 18 heures les parts relatives de chacun des produits se sont inversées, pour aboutir en 24 heures, à un rendement en produit dihydroxylé identique à celui du 1er cycle.

La réaction est donc beaucoup plus rapide que dans les expériences d'immobilisation sur trame de nylon puisque la quantité maximale de 44' dihydroxybenzophénone était obtenue en 72 heures ou en 96 heures et que, dans le même temps, une très

faible quantité de 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone était encore visible. Dans les 2 cas avec la même concentration en substrat, le rendement estimé est identique mais dans cette expérience la productivité optimale est très nettement supérieure : elle est de 4,20 mg/l/jour au bout de 24 heures contre 1,40 mg/l/jour (calculée sur les premières 72 heures) dans l'expérience sur trame de nylon.

Le support d'immobilisation peut expliquer cette amélioration du rendement. En effet, la surface de fixation disponible sur une structure annulaire est plus importante que sur une trame de nylon ; le champignon a formé un fin voile mycélien qui tapisse l'extérieur mais aussi l'intérieur des anneaux. De plus l'air comme le milieu de bioconversion doit trouver un cheminement dans les espaces inter- et intra-annulaires. Cette configuration améliore le contact entre le mycélium, le milieu (contenant le substrat) et l'oxygène de l'air. En outre, le volume utile de cette colonne est nettement plus faible que celui de la colonne avec la trame donc la quantité de substrat à transformer dans la 1ère colonne est moindre puisque les concentrations en substrat sont identiques. Il en résulte une efficacité accrue de la bioconversion.

Jusqu'au 6ème cycle ce rendement est maintenu, mais à partir du 7ème il descend à 45% en 24 heures, puis diminue encore au 9ème cycle. Au cours de ce dernier, il reste encore de la 4 hydroxy-4' méthoxybenzophénone en 24 heures.

Pour finir, pendant le 12ème cycle, même en 96 heures, le substrat n'est pratiquement plus O-déméthylé. Dans nos conditions, la transformation du substrat est correcte jusqu'au 10ème cycle alors que dans l'immobilisation sur trame la réaction s'était poursuivie pendant 18 cycles. Néanmoins, il faut rappeler que dans ce cas nous avons observé, à partir du 8ème cycle un nouveau développement mycélien, qu'apparemment nous n'avons pas sur les anneaux de Raschig.

Sur 11 cycles (13 jours), la production totale

estimée de 44' dihydroxybenzophénone est de 36 mg soit un rendement de 41%. La productivité moyenne estimée, avec 2,80 mg/l/jour, est donc la plus élevée que nous ayons obtenues jusqu'à présent.

Cette expérience ne constituant qu'un test de faisabilité, nous avons fixé arbitrairement les conditions de travail. Mais, comme dans l'expérience d'immobilisation sur trame de nylon, l'influence de nombreux éléments reste à étudier, par exemple le débit d'air ou la taille des anneaux de Raschig. Nous avons fait une tentative de fonctionnement en continu mais il ne nous a pas été possible de maintenir constant le niveau du liquide dans la colonne en raison des flux opposés d'air et de milieu. Le débit de milieu doit jouer un rôle dans le rendement de la réaction et pourrait être réglé pour que le temps de séjour dans la colonne soit de 24 heures. Dans cette éventualité, le substrat serait totalement transformé en sortie de colonne. Pour obtenir un résultat identique, une autre possibilité consiste à monter en série plusieurs colonnes comme l'ont expérimenté ROYER et coll. (1983) pour décolorer les liqueurs de kraft.

D'autres modifications sont envisageables. Par exemple de nombreux auteurs (BAKLASHOVA et coll., 1984 ; TOLDRA et coll., 1986 ; PARASCANDOLA et coll., 1987...) ont adopté un flux ascendant pour le milieu : cette méthode évite les flux à contre-courant d'air et de milieu. Ce problème peut également être supprimé en faisant percoler le milieu le long du mycélium : celui-ci n'étant pas immergé, l'aération deviendrait inutile.

En conclusion, malgré une durée d'utilisation de la même charge mycélienne assez courte, cette méthode d'immobilisation sur anneaux de Raschig semble très prometteuse. En effet la vitesse de réaction est augmentée par rapport aux essais sur trame de nylon mais aussi par rapport aux essais en fioles d'Erlenmeyer alors que l'optimisation reste à faire.

4 - MISE EN OEUVRE EN MILIEU ORGANIQUE

Nous avons vu qu'en milieu aqueux la concentration en substrat reste faible en raison de problèmes de solubilité et malgré l'utilisation d'un cosolvant. Pour s'affranchir de cette difficulté, nous avons testé les capacités O-déméthylantes d'*Aspergillus niger* en conditions organiques. De plus une réaction fonctionnant en milieu organique simplifie la mise en oeuvre puisque les contraintes de stérilité du milieu ont disparues.

4-1 : Transformation par du mycélium frais

Les "pellets" sont lavés avec le milieu organique étudié pour éliminer toute trace de milieu de croissance (Annexe VIII-7). Dans tous les essais réalisés précédemment, le milieu de bioconversion contenait 4% d'acétone qui servaient à dissoudre le substrat. Pour ces premiers essais en milieu organique, nous avons choisi d'augmenter le pourcentage en acétone. La 44' diméthoxybenzophénone étant soluble dans les éthers, nous avons réalisé un mélange constitué à parts égales d'acétone et de méthyl tertio butyl éther (MTBE). Cet éther présente, entre autres avantages, une moindre volatilité que l'éther éthylique.

La 44' diméthoxybenzophénone n'a été transformée dans aucun des milieux testés durant les 96 heures de la réaction. Pour des concentrations en acétone égales ou supérieures à 10%, la O-déméthylation du substrat n'a pas lieu alors qu'à 4% elle est totale. Nous pouvons avancer l'existence d'une concentration critique, comprise entre 4 et 10%, au delà de laquelle la réaction est inhibée.

4-2 : Transformation par du mycélium dévitalisé

La dessiccation d'une culture microbienne entraîne la perte de vitalité : le métabolisme étant stoppé, mais les activités enzymatiques sont conservées. Pour une application industrielle l'utilisation d'un tel mycélium, moins délicat à manipuler, serait un atout supplémentaire. De plus la perméabilité aux substrats est généralement améliorée suite à la déstabilisation de la paroi et de la membrane plasmique. Ces préparations cellulaires dévitalisées peuvent être obtenues par déshydratation avec l'acétone (poudre acétonique) ou par lyophilisation. Dans tous les cas il faut s'attacher à éliminer rapidement l'eau des cellules.

4-2-1 : Essai avec de la poudre acétonique

Dans l'expérience précédente, la quantité d'eau présente dans l'essai avec l'acétone pure n'était pas négligeable par rapport au volume d'acétone. Or il est établi que des enzymes peuvent être dénaturés par des solvants organiques mélangés à des solutions aqueuses. La méthode de préparation de la poudre acétonique élimine ce risque, elle est détaillée en annexe VIII-8.

La 44' diméthoxybenzophénone n'a été O-déméthylée ni dans le milieu de bioconversion ni dans le tampon tris-maléate. En outre chaque filtrat acétonique récupéré lors de la préparation de la poudre acétonique a été mis en contact avec le substrat sans aucun résultat. L'activité O-déméthylante est perdue, le lavage du mycélium par l'acétone entraîne certainement des modifications trop importantes de la structure mycélienne qui interdisent toute activité de cette nature.

4-2-2 : Essai avec du mycélium lyophilisé

La lyophilisation, en éliminant l'eau d'une

préparation, stabilise les activités enzymatiques. Ainsi, elles peuvent être conservées un certain temps si le lyophilisat est stocké à moins 20°C ou dans un dessiccateur. Avec cette technique l'intégrité cellulaire est également altérée mais par une action mécanique, sans intervention d'aucun solvant. Le protocole opératoire est donné en annexe VIII-9.

Que ce soit sous air, sous oxygène, avec ou sans eau la bioconversion n'a pas lieu mais le milieu organique n'est pour rien dans ce résultat négatif. En effet les témoins réalisés en milieu aqueux pour contrôler et évaluer la capacité de transformation d'un mycélium lyophilisé, n'ont pas révélé la moindre trace de transformation de la 44' diméthoxybenzophénone.

HAMAMCI et HANG (1989) ont montré que du mycélium d'*Aspergillus niger* immobilisé et desséché pouvait produire de l'acide citrique, or *Aspergillus niger*, qu'il soit sous forme de poudre acétonique ou lyophilisé, ne peut plus O-déméthyliser la 44' diméthoxybenzophénone. Toutefois le mycélium lyophilisé conserve sa capacité à régénérer du mycélium qui, lui, transforme le substrat. Ces traitements doivent donc, soit dénaturer le système enzymatique impliqué, soit modifier l'accessibilité au site d'action par suite d'une altération de la structure. Par conséquent, pour envisager une bioconversion en milieu organique, il faut au préalable que la méthode de préparation du matériel fongique n'entraîne pas une perte de l'activité O-déméthylante en milieu aqueux.

5 - CONCLUSION

Bien que les essais en conditions organiques avec de la poudre acétonique ou du mycélium lyophilisé se soient révélés négatifs, nous avons montré que la réaction est réalisable à plus grande échelle. Dans le tableau VIII-9 nous avons récapitulé les résultats obtenus avec les différents types de réacteur.

Tableau VIII-9 : Résultats comparés avec les différents fermenteur.

	Mycélium libre			Mycélium immobilisé		
	Fioles	Réacteur de 2 litres	Réacteur de 14 litres	Trame de nylon (8 mg/l)	Trame de nylon (200 mg/l)	Anneaux de Raschig
Productivité optimale (mg/l/jour)	2,30	2,28	2,15	1,40	3,54	4,20
Rendement optimal (%)	65	64	61	60	12	60
Productivité moyenne (mg/l/jour)	/	/	/	1,02	2,20	2,80
Rendement moyen (%)	/	/	/	42	8	41
Production totale de B (mg)	/	/	/	65	170	36

En cuves de fermentation avec du mycélium libre, la cinétique de la réaction est identique à celle obtenue en fioles d'Erlenmeyer : l'augmentation du volume réactionnel n'a pas eu de conséquences sur le rendement et sur la productivité. Néanmoins étant donné la faible concentration en substrat utilisable, ce type de fermentation n'est pas avantageux car il faut séparer les produits formés et le mycélium.

Avec un mycélium immobilisé, les produits sont récoltés plus aisément. Lors de l'immobilisation sur trame de nylon, après modification du milieu, une même charge mycélienne a transformé du substrat durant plus de 60 jours. Le rendement optimal estimé est identique à celui obtenu en fioles mais la vitesse de réaction étant diminuée, la productivité optimale estimée est moindre. Pour toute la durée de la bioconversion, le rendement moyen estimé est de 42% et la productivité moyenne estimée de 1,02 mg/l/jour. Ces valeurs sont beaucoup plus faibles que celles obtenues avec le mycélium libre mais la production totale de 44' dihydroxy-benzophénone, à partir d'une seule charge mycélienne, est estimée à 65 mg. En augmentant la concentration en substrat, le rendement moyen estimé s'effondre (8%) mais la productivité moyenne estimée est équivalente à celles obtenues avec du mycélium libre. Le substrat étant fourni à une concentration plus élevée, la production totale de 44' dihydroxybenzophénone est estimée à 170 mg mais les pertes sont très importantes.

Le résultat le plus intéressant a été obtenu lors de l'immobilisation sur anneaux de Raschig : par rapport aux essais en fioles, la productivité optimale estimée est presque multipliée par 2 pendant les 6 premiers cycles (6 jours) et le rendement estimé est équivalent. Toutefois le champignon s'épuise rapidement puisque le réacteur n'a fonctionné que durant 11 cycles (13 jours) et le rendement moyen estimé descend à 41% tandis que la productivité moyenne estimée passe de 4,20 à 2,80 mg/l/jour.

Ces résultats avec du mycélium immobilisé présentent déjà un grand intérêt mais nous pouvons espérer améliorer encore ces performances en modifiant certaines conditions. Le rendement de bioconversion peut être influencé par le débit d'air, le pourcentage d'oxygène ou la taille des anneaux de Raschig. Nous pouvons supposer que l'optimisation du milieu de bioconversion, la détermination de la concentration optimale ou le fractionnement de l'alimentation en substrat et l'amélioration du réacteur avec les anneaux de Raschig entraîneront une meilleure bioconversion.

CHAPITRE IX

TRANSFORMATION D'AUTRES SUBSTRATS

1 - INTRODUCTION

Nous avons cherché à savoir si *Aspergillus niger* ne pouvait O-déméthyliser que la 44' diméthoxybenzophénone ou si des substrats de structure plus ou moins proche pouvaient également être transformés en leurs dérivés hydroxylés.

Dans la littérature nous avons trouvé des exemples de bactéries (*Nocardia* ou *Pseudomonas*) capables de O-déméthyliser des acides benzoïques méthoxylés (CRAWFORD et coll., 1973 ; RIBBONS, 1970). Lors d'une étude sur le métabolisme des composés aromatiques apparentés aux lignines, HENDERSON (1961) a montré que certains champignons comme *Pullularia pullulans*, *Margarinomyces heteromorpha* ou *Margarinomyces mutabilis* O-déalkylent aussi les acides ortho-, méta- et para-méthoxybenzoïques. En outre, certaines souches d'*Aspergillus niger* hydroxylent des acides organiques comme l'acide benzoïque en position 4 (REDDY et VAIDYANATHAN, 1975 ; VAN BALKEN et coll., 1987) ou l'acide phénylacétique en position 2 (KOHMOTO et coll., 1970 ; SUGUMARAN et

VAIDYANATHAN, 1979). Nous pouvons penser que le système enzymatique d'*Aspergillus niger* pourra O-déméthyliser ces acides méthoxylés.

L'anisole (ou méthoxybenzène) est le produit le plus simple dans la série des benzènes méthoxylés. FERRIS et coll. (1976) ont montré que sa O-déméthylation et sa 4 hydroxylation sont les 2 voies oxydatives privilégiées par *Cunninghamella bainieri*. Par contre, *Aspergillus niger* (Van Tiegh.) n'hydroxyle pas en position méta ou para : seule la position ortho est fonctionnalisée pour donner le guaïacol (2-hydroxyanisole) (BOCKS et coll., 1964). Mais cette souche d'*Aspergillus niger* est aussi capable de O-déméthyliser l'anisole puisque ces auteurs ont détecté une quantité de phénol équivalente à celle du guaïacol. BOCKS (1967) a testé quatre souches d'*Aspergillus niger*, qui toutes transforment l'anisole en phénol.

La souche d'*Aspergillus niger* (ATCC 9142) utilisée par SMITH et ROSAZZA (1974) a O-déméthylé l'anisole mais ne l'a pas hydroxylé. Toutefois elle a hydroxylé l'acide benzoïque, le biphényle, le naphthalène et le stilbène.

Les capacités O-déméthylantes d'*Aspergillus niger* ne semblent pas limitées à un seul type de molécules. Nous avons donc choisi une série de méthoxybenzènes plus ou moins substitués afin de déterminer, pour notre souche d'*Aspergillus niger*, la structure minimale nécessaire à la O-déalkylation.

2 - NOUVEAUX SUBSTRATS ET O-DEMETHYLATION

Le protocole opératoire est identique à celui mis en place pour l'étude de la 44' diméthoxybenzophénone (Annexe III-2). Après 3 jours de croissance le substrat, dissous dans l'acétone, est ajouté au milieu à raison de 2 ml par fiole. Les substrats ont généralement été testés à la concentration finale habituelle de 8 mg/l mais certains ont fait l'objet d'essais à

des concentrations plus élevées. Les divers systèmes de solvants sont présentés en annexe IX.

2-1 : Benzènes méthoxylés

2-1-1 : Anisole

La molécule benzénique méthoxylée la plus simple est l'anisole qui donne du phénol par O-déméthylation :



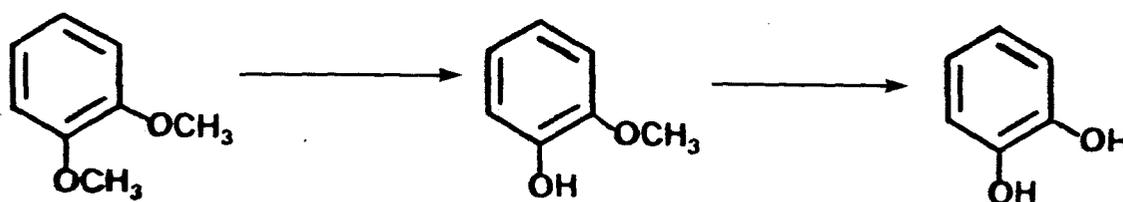
Anisole (Rf=0,80)

Phénol (Rf=0,59)

Les concentrations d'anisole testées sont égales à 8 , 80 et 400 mg/l. Dans ces 3 essais aucune transformation n'est visualisée durant 96 heures. Notre souche d'*Aspergillus niger*, contrairement à celles de BOCKS (1967) et SMITH et ROSAZZA (1974), n'est pas capable de O-déméthyliser ce composé aromatique.

2-1-2 : Vératrole

Le vératrole est le dérivé diméthoxylé en position 1 et 2 du benzène. Nous pouvons donc obtenir le composé mono-O-déméthylé, le guaïacol, et le composé di-O-déméthylé, le catéchol :



Vératrole
(Rf=0,81)

Guaïacol
(Rf=0,67)

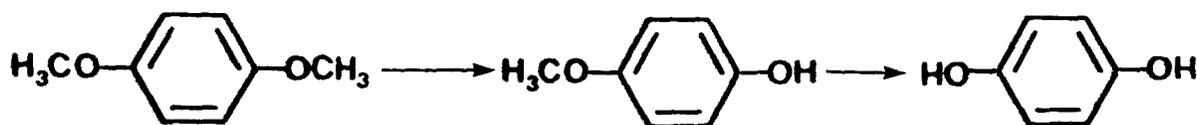
Catéchol
(Rf=0,22)

Une série d'essais a été réalisée avec 8 , 400 et 4000 mg/l de vératrole. Les réactions ont été suivies pendant 96 heures ; celle avec 400 mg/l de substrat a été prolongée jusqu'au 10ème jour mais aucune transformation n'est obtenue.

Nous avons effectué une 2ème série d'essais avec le guaïacol qui possède encore une fonction méthoxyle. En 96 heures, aucun produit n'est apparu. La présence ou l'absence d'un hydroxyle phénolique libre ne joue aucun rôle dans la O-déméthylation du vératrole. La présence du 2ème groupement fonctionnel en ortho provoque un encombrement stérique qui peut interdire l'accès du site au système enzymatique. Pour vérifier cette hypothèse nous avons choisi de tester un substrat ne provoquant pas l'encombrement du site comme le 1,4 diméthoxybenzène.

2-1-3 : 1,4 diméthoxybenzène

Le 1,4 diméthoxybenzène, comme le vératrole, peut subir deux O-déméthylations :



1,4 diméthoxybenzène

4 méthoxyphénol

Hydroquinone

L'hydroquinone, sous l'action d'enzymes comme les laccases, est transformée en quinone.

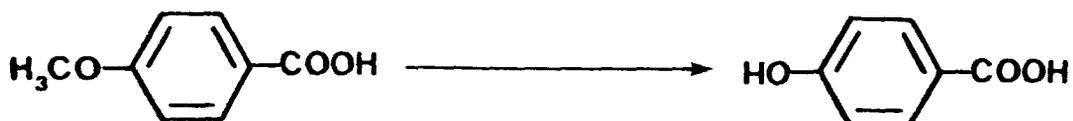
Ce produit a été testé à 8 et 400 mg/l. Une série d'essais a été poursuivie pendant 11 jours sans succès. Le substrat n'a pas été O-déalkylé : l'hypothèse émise dans le cas du vératrole n'est pas vérifiée, l'encombrement du site de la réaction n'est en rien responsable de la non transformation du substrat. Il faudrait peut-être voir si la présence d'une

chaîne latérale plus longue ou celle de 2 noyaux benzéniques ou celle d'une fonction carbonyle ne sont pas indispensables à la fixation sur le site enzymatique.

2-2 : Acides méthoxybenzéniques

2-2-1 : Acide anisylique

L'acide anisylique est un acide benzoïque (acide para-méthoxybenzoïque) qui, une fois O-déalkylé, donne l'acide para-hydroxybenzoïque :



Ac. anisylique
(Rf=0,73)

Ac. para-hydroxybenzoïque
(Rf=0,52)

Cette étude a été poursuivie pendant 4 jours mais le produit ne se forme pas alors qu'en 24 heures l'acide anisylique a pratiquement disparu. Aucune autre tache chromatographique n'étant visible, soit le substrat se fixe sur le champignon et n'est donc plus détecté, soit il est entièrement métabolisé.

2-2-2 : Acide férulique

C'est le dérivé acide d'un des monomères de la lignine (alcool coniférylique). Nous obtenons l'acide caféique après O-déméthylation :



Acide férulique (Rf=0,70)

Acide caféique (Rf=0,31)

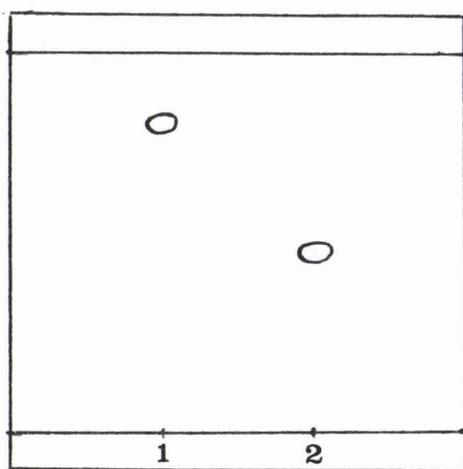
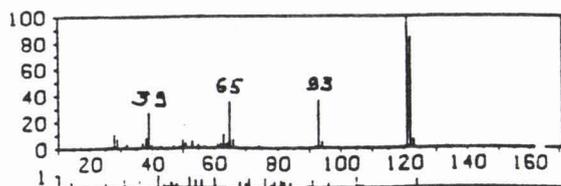


Figure IX-1 : Bioconversion du trans-anéthole : profil migratoire sur CCM.

1 = trans-anéthole, 2 = produit dont le Rf est égal à 0,47.



Spectre de référence du
para-hydroxybenzaldéhyde

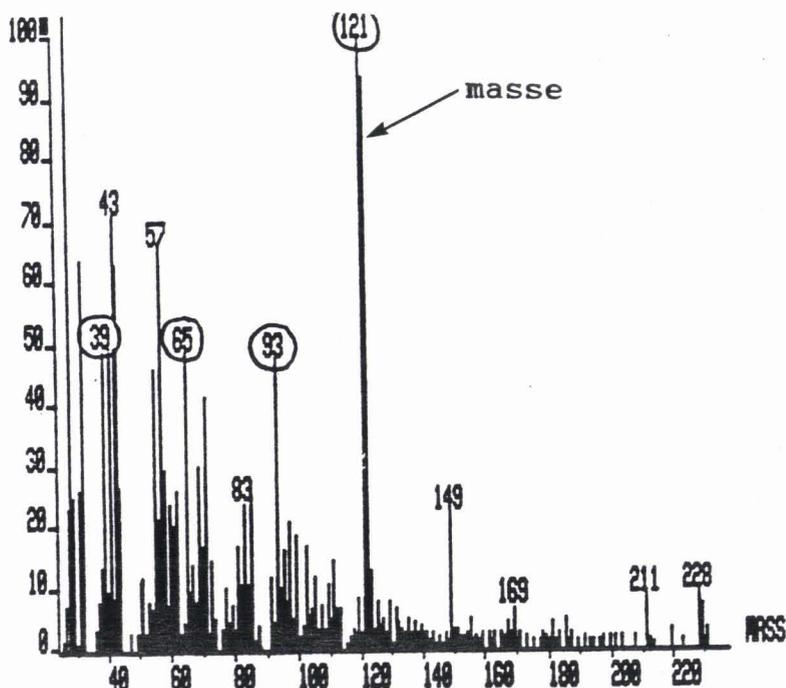


Figure IX-2 : Spectre de masse du produit de transformation du trans-anéthole.

Nous obtenons le même type de réponses qu'avec l'acide anisylrique : aucune tache nouvelle n'apparaît sur le profil chromatographique mais la tache de substrat a déjà disparu en 24 heures. KIRK et LORENZ (1974) avaient constaté la même chose avec l'acide 4-benzyloxy 3-éthoxybenzoïque, ils avaient conclu à une métabolisation totale de ce produit. La présence de la fonction acide facilite la dégradation de ces molécules.

Les autres substrats retenus ont, comme la 4,4'-diméthoxybenzophénone, une chaîne latérale greffée en position 4 sur le cycle benzénique par rapport au groupement méthoxyle (position para).

2-3 : Substrats avec une double liaison en α

2-3-1 : Trans-anéthole

La O-déméthylation du trans-anéthole conduit au produit suivant :



Trans-anéthole (Rf=0,81)

1-hydroxy 4-(1-propényl)benzène

Le trans-anéthole a été étudié aux concentrations de 8 et 40 mg/l. Nous n'avons pas indiqué la valeur de Rf du produit hydroxylé car il n'est pas commercialisé. Dans les essais, dès 24 heures de contact, nous voyons apparaître très nettement un composé dont le Rf est égal à 0,47 (Figure IX-1). Dans le même temps avec 8 mg/l le trans-anéthole a quasiment disparu. Le spectre de masse de ce composé (Figure IX-2) ne correspond pas à celui du composé attendu. Le doublet d'ions

m/z 121/122 ainsi que les ions m/z 39, m/z 65 et m/z 93 sont caractéristiques du spectre de masse du para-hydroxybenzaldéhyde



La O-déméthylation a eu lieu mais la molécule a vu sa liaison carbone α - carbone β rompue très probablement après oxydation préalable de la double liaison.

2-3-2 : 4 méthoxystilbène

Cette molécule, par rapport à la précédente, possède un 2ème cycle benzénique, elle est ainsi conjuguée dans sa totalité, le produit de la réaction escompté est le 4 hydroxystilbène :



4 méthoxystilbène (Rf=0,82)

4 hydroxystilbène (Rf=0,51)

Le 4 méthoxystilbène reste intact alors qu'avec le trans-anéthole une réaction a lieu. Les deux molécules possédant la même structure, deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette différence. Dans la 1ère, la présence d'un 2ème cycle benzénique en α de la double liaison bloquerait la réaction, dans la 2ème, ce serait l'oxydation ou la rupture de la double liaison qui permettrait la O-déméthylation, en modifiant la structure du trans-anéthole. Ici, cette double liaison est particulièrement solide car protégée par les noyaux aromatiques.

2-4 : Substrats avec une fonction cétone en α

Ces substrats sont les plus proches structurellement de la 44' diméthoxybenzophénone.

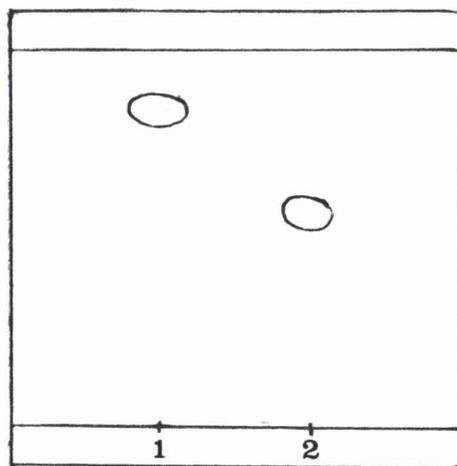


Figure IX-3 : Bioconversion de la 4'méthoxychalcone : profil migratoire sur CCM.

1 = 4'méthoxychalcone, 2 = produit dont le Rf est égal à 0,56.

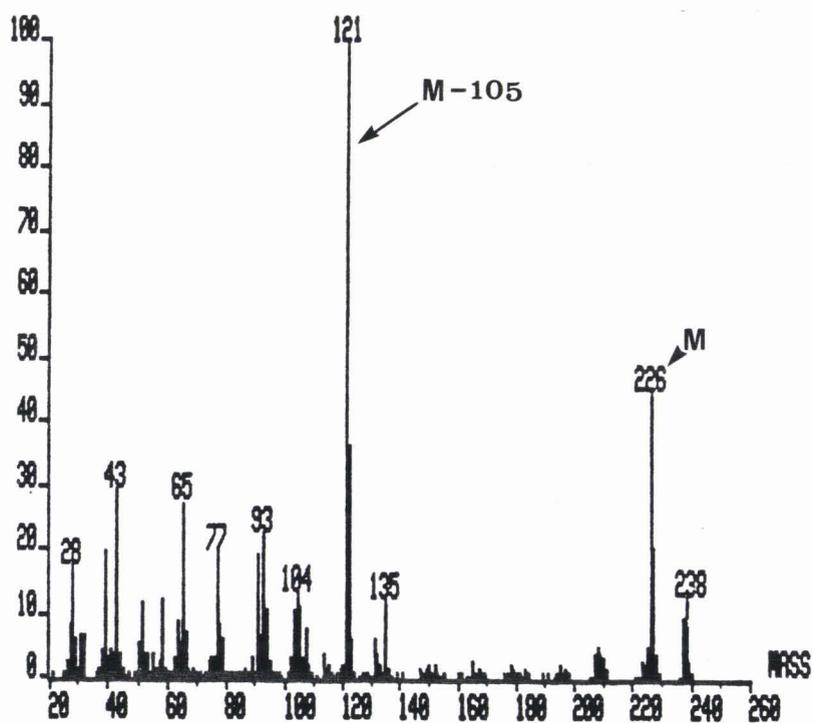


Figure IX-4 : Spectre de masse du produit de transformation de la 4'méthoxychalcone.

2-4-1 : 4 Méthoxyacétophénone

C'est le produit le plus simple de la série :



4 méthoxyacétophénone
(Rf=0,77)

4 hydroxyacétophénone
(Rf=0,46)

Durant les 96 heures de la réaction, le substrat n'est pas transformé or nous avons une fonction cétone en α comme avec la 44' diméthoxybenzophénone mais il n'y a pas de 2ème cycle benzénique et la chaîne latérale est très courte.

2-4-2 : 4' Méthoxychalcone

Dans ce produit nous avons un 2ème cycle benzénique qui est séparé de la fonction cétone par deux carbones éthyléniques :



4' méthoxychalcone (Rf=0,83)

4' hydroxychalcone

Le produit attendu n'étant pas disponible, sa valeur de Rf est inconnue. Après 24 heures de contact avec le substrat, il apparaît un produit avec un Rf égal à 0,56 (Figure IX-3). L'analyse par spectrométrie de masse montre que le doublet d'ions m/z 223/224 caractéristique du spectre de masse de la 4' hydroxychalcone n'existe pas (Figure IX-4), mais les ions m/z 226 et m/z 121 sont compatibles avec la structure ci-dessous :

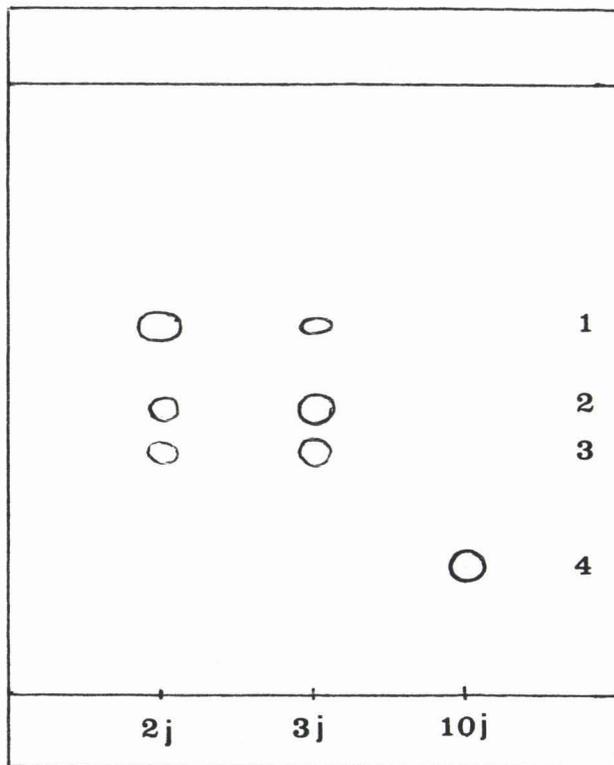
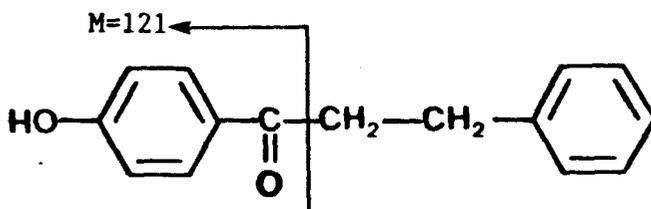


Figure IX-5 : Bioconversion de l'anisoïne : profil migratoire sur CCM.

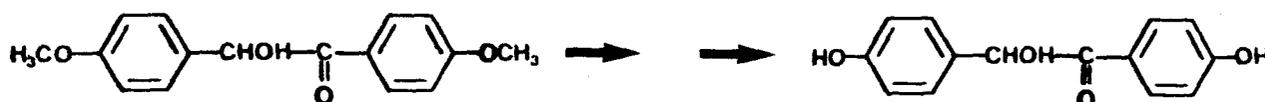
1 = anisoïne, 2 = produit dont le Rf est égal à 0,47, 3 = produit dont le Rf est égal à 0,40, 4 = produit dont le Rf est égal à 0,21.



La O-déméthylation a été obtenue mais la double liaison entre les carbones C β et C γ a été hydrogénée. Un processus purement chimique peut être à l'origine de cette réduction mais il faut signaler les travaux de RAO et SUNDARAMURTHY (1986) qui ont montré que les hydroxychalcones ont une très forte activité fongicide envers *Aspergillus niger*. L'hydrogénation peut donc correspondre à une réaction de défense de cet organisme dans la mesure où la molécule hydrogénée est moins toxique.

2-4-3 : Anisoïne

Ce substrat nécessite un système de solvants plus polaire que ceux précédemment utilisés à cause de sa fonction alcool secondaire :



Anisoïne
(Rf=0,60)

44' dihydroxybenzoïne
(Rf=0,21)

Nous avons réalisé des essais avec 8 et 400 mg/l d'anisoïne. Dans tous les cas, il apparaît en 48 heures deux taches avec des valeurs de Rf de 0,40 et 0,47. En 72 heures, dans l'essai le moins concentré, il ne reste pratiquement plus d'anisoïne. Enfin en 10 jours nous observons une tache avec un Rf identique à celui de la 44' dihydroxybenzoïne (Figure IX-5).

La réaction est moins rapide qu'avec la 44' diméthoxybenzophénone, quant aux 2 taches intermédiaires,

elles pourraient correspondre aux 2 composés mono-O-déméthylés. Le produit avec un Rf de 0,21 migre, dans de l'éther éthylique, avec un Rf de 0,41 comme la 44' dihydroxybenzoïne.

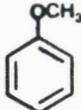
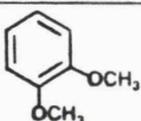
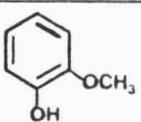
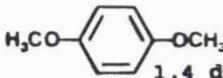
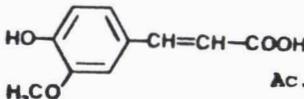
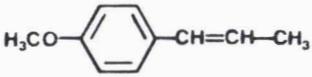
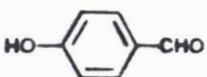
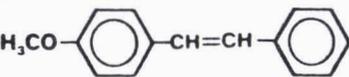
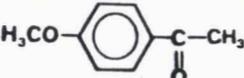
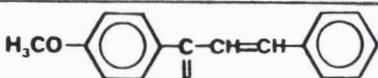
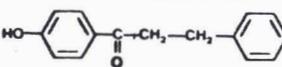
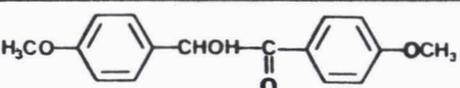
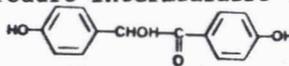
3 - DISCUSSION

Le trans-anéthole ou 1-méthoxy 4-(1-propényl)benzène a été O-déméthylé mais la liaison carbone α - carbone β a été rompue. Il serait intéressant de tester le dérivé "propyl" : la double liaison étant déjà réduite, il ne devrait pas y avoir cassure de la molécule.

Le 4 méthoxystilbène possède un 2ème cycle benzénique mais sa structure est comparable à celle du trans-anéthole, or la molécule n'est ni cassée ni O-déméthylée. Etant encadrée par 2 noyaux benzéniques, la double liaison est probablement plus solide car la molécule est entièrement conjuguée. Nous avons supposé que le trans-anéthole est O-déméthylé après l'oxydation puis la rupture de sa double liaison ce qui signifierait qu'une fonction carbonyle en α est nécessaire.

Toutefois, la bioconversion de la 4 méthoxy-acétophénone, qui possède cette fonction cétone, n'est pas obtenue. Si nous l'expliquons par une chaîne latérale trop courte, il n'est pas logique de penser que le trans-anéthole est clivé avant d'être O-déméthylé car la chaîne latérale est réduite à une fonction aldéhyde plus courte que celle de la 4 méthoxyacétophénone. Il faut donc admettre que la O-déméthylation intervient entre l'étape d'oxydation de la double liaison et sa rupture et non après celle-ci. Dans ce cas ce n'est plus une fonction carbonyle sur le carbone α qui est indispensable à la O-déméthylation mais seulement un oxygène.

Tableau IX : Résultats obtenus avec les différentes molécules testées.

Substrat	Produit	Remarques
 <p>Anisole</p>	/	
 <p>Vératrole</p>	/	
 <p>Guaiacol</p>	/	
 <p>1,4 diméthoxybenzène</p>	/	
 <p>Ac. anisyligue</p>	/	Dégradation totale probable
 <p>Ac. férulique</p>	/	Dégradation totale probable
 <p>trans-anéthole</p>	 <p>para-hydroxybenzaldéhyde</p>	O-déméthylation entre l'oxydation et la coupure
 <p>4 méthoxystilbène</p>	/	Absence d'atome d'oxygène en α du cycle
 <p>4 méthoxyacétophénone</p>	/	Chaîne latérale trop courte
 <p>4' méthoxychalcone</p>		O-déméthylation mais réduction de la double liaison
 <p>Anisoïne</p>	<p>produit intermédiaire +</p>  <p>4,4'dihydroxybenzoïne (probable)</p>	Molécule O-déméthylée sans modification de la structure

4 - CONCLUSION

Dans le tableau IX, nous avons récapitulé les différentes molécules testées. Cette étude nous a permis d'avoir une idée plus précise du type de molécules pouvant être O-déméthylées par *Aspergillus niger*.

Les molécules simples comme le vératrole ou le guaiacol ne sont pas O-déméthylées mais l'encombrement du site enzymatique n'intervient pas puisque l'anisole et le 1,4 diméthoxybenzène ne sont pas transformés.

Les acides méthoxybenzéniques ne sont pas O-déméthylés mais ils disparaissent du milieu : ils sont probablement métabolisés car la fonction acide facilite la dégradation de telles molécules.

Les autres molécules testées nous ont permis de conclure à la nécessité d'un oxygène en α du cycle benzénique et d'une chaîne latérale, puisque respectivement le 4 méthoxystilbène et la 4 méthoxyacétophénone n'ont pas été O-déméthylés. Un 2ème noyau benzénique ne semble pas indispensable puisque le trans-anéthole a été transformé.

Enfin l'anisoïne est le seul substrat testé qu'*Aspergillus niger* O-déméthyle sans le modifier.

CONCLUSIONS GENERALES

Au travers de leurs recherches, leurs améliorations et leurs applications, les capacités hydroxylantes et O-déméthylantes des champignons filamenteux ont servis de fil conducteur durant ces travaux.

Nous avons d'abord présenté les deux molécules modèles, la benzophénone et la 44' diméthoxybenzophénone, ainsi que la méthode utilisée pour caractériser les différents produits de réaction. Nous avons adopté une technique simple, rapide et sensible : la chromatographie sur couche mince. Au cours d'une étude préliminaire nous avons défini les conditions de milieu et d'éclairement propres à chacun des deux substrats.

Ces conditions étant fixées, nous avons procédé au "screening". Les résultats ont montré que la 44' diméthoxybenzophénone est, sans contestation possible, le substrat le plus apte à former des dérivés hydroxylés. La benzophénone est

également transformée mais la position 4 n'est pas la seule hydroxylée or nous recherchons une réaction exclusivement spécifique de cette position. Quant au microorganisme, *Aspergillus niger* a manifesté les plus grandes potentialités pour O-déméthylé ce substrat.

Faisant suite à ce choix du substrat et du champignon, nous avons mis au point un dosage de la 44' diméthoxybenzophénone, et de ses produits de transformation, par HPLC ce qui nous a conduits à instaurer un contrôle précis de certains facteurs comme la densité de l'inoculum ou la concentration en substrat, afin d'améliorer la reproductibilité de ce dosage.

L'étude de la O-déméthylation elle-même, a été abordée dans la 2ème partie.

Dans un premier temps nous avons déterminé le moment le plus propice à l'addition de la 44' diméthoxybenzophénone : une addition entre le 2ème et le 5ème jours de croissance permet une meilleure O-déméthylation. Nous avons montré que les filtrats de culture ne sont pas capables de O-déméthylé la 44' diméthoxybenzophénone : le ou les enzymes responsables de cette réaction ne sont probablement pas des enzymes extracellulaires ou bien ils ne sont pas sous une forme active. Dans les filtrats de culture, nous avons parallèlement vérifié l'absence de laccase ou de lignine-peroxydase qui interviennent dans la biodégradation des lignines en O-déméthylant certaines structures complexes.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence des facteurs nutritifs. Nous avons remplacé la source carbonée habituelle, le glucose, par du lactate ou du glycérol mais les taux de bioconversion sont très faibles. Nous avons donc conservé le glucose et nous avons montré qu'avec une concentration initiale de 10 g/l, la transformation du substrat est rapide et totale. Pour la 44' dihydroxybenzophénone, le

rendement est égal à 65% et la productivité, calculée sur les premières 48 heures, est de 2,31 mg/l/jour.

En outre, une élimination complète des oligoéléments provoque une inhibition presque totale de la réaction. Une étude plus fine a permis d'établir que le fer est essentiel à l'activité de cet ou ces enzymes puisque l'absence de Fe^{2+} inhibe presque totalement la réaction tandis qu'une addition de Fe^{3+} augmente la vitesse de la bioconversion : par exemple en 12 heures il y a 7 fois plus de produit final que dans le témoin. L'absence de zinc inhibe aussi la réaction mais de façon moins sensible qu'en l'absence de Fe^{2+} .

Le 3ème volet de cette étude sur l'influence de différents facteurs a porté sur l'environnement physico-chimique de la réaction : il a été démontré le rôle primordial de l'oxygénation ainsi que celui des détergents. La présence de tween 80 à 0,05% dès le début de la croissance, accélère la bioconversion du substrat et une seconde addition, en même temps que le substrat, améliore le rendement de la bioconversion d'environ 20 %. Nous avons également montré que la lumière n'intervient pas dans la réaction et que pour des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 7,5, la O-déméthylation n'est pas perturbée.

Enfin, nous avons constaté qu'avec une densité d'inoculum plus élevée, la vitesse de croissance est augmentée : il faut donc avancer le moment d'addition du substrat pour que les courbes de formation de chaque produit coïncident avec celles tracées avec des cultures dont l'inoculum est plus faible. La nature du solvant utilisé pour dissoudre le substrat a également toute son importance puisqu'un solvant comme le DMSO inhibe la O-déméthylation. Une étude sur le substrat a montré qu'une addition supplémentaire, 24 heures après la 1ère addition, améliore le rendement global de la réaction. Toutefois au delà de 2 additions, la réaction s'arrête.

Dans la 3ème partie nous avons élargi le champ d'application de cette réaction à d'autres procédés ou substrats.

L'immobilisation du mycélium sur trame de nylon a permis de transformer du substrat en semi-continu pendant 18 cycles (2 mois). Bien que la productivité moyenne ait diminuée (1,02 mg/l/jour contre 2,30 mg/l/jour dans les fioles), la production totale de 44' dihydroxybenzophénone a été estimée à 65 mg ; le système est donc plus rentable.

Lorsque la concentration en substrat est multipliée par 25, la durée de vie de la trame est réduite de 18 à 7 cycles (50 jours). La productivité moyenne estimée (2,20 mg/l/jour) est du même ordre de grandeur que celle obtenue en fioles. Globalement la quantité de produit formé est plus importante, elle est estimée à 170 mg, mais le rendement moyen s'est effondré : il est d'environ 8% au lieu de 65%.

Lors de l'immobilisation sur anneaux de Raschig une vitesse de réaction multipliée par 2 a été maintenue pendant 7 cycles : la productivité optimale (estimée sur les premières 24 heures) est de 4,20 mg/l/jour avec un rendement optimal estimé de 60%. Sur 11 cycles (13 jours), la productivité moyenne estimée est de 2,80 mg/l/jour, soit 1,2 fois plus élevée qu'en fioles, avec un rendement moyen estimé de 41%. La production totale de 44' dihydroxybenzophénone estimée sur toute la durée du réacteur est de 36 mg : c'est de loin le meilleur résultat. De plus il semble évident qu'une étude précise des conditions de réaction pourrait conduire à l'obtention d'un meilleur rendement.

Pour finir, l'étude menée avec d'autres substrats révèle que les benzènes méthoxylés comme l'anisole, le vératrole ou le 1,4 diméthoxybenzène, ne sont pas O-déméthylés tandis que les acides méthoxylés (acides anisylrique et férulique) sont très certainement dégradés. La transformation de molécules plus complexes comme la 4' méthoxychalcone ou l'anisoïne, semble indiquer la nécessité d'un atome d'oxygène sur le carbone en α du cycle aromatique mais montre également

que la longueur de la chaîne latérale n'est pas un élément négligeable puisque la 4 méthoxyacétophénone n'est pas transformée. Il serait intéressant de tester statistiquement un grand nombre de molécules de ce type pour vérifier cette hypothèse.

ANNEXE I-1
CONDITIONS DE CULTURE

BASIDIOMYCOTINES

ENTRETIEN DES SOUCHES

Les souches sont repiquées régulièrement sur milieu L de ODDOUX (1957) gélosé à 20 g/l en tubes inclinés, la température de croissance est de 23°C. Elles sont ensuite conservées à 4°C.

COMPOSITION DU MILIEU L DE ODDOUX

Glucose	16,5 g/l
Extrait de malt	3,5 g/l
Tartrate de sodium	0,35 g/l
L-asparagine	0,5 g/l
Hydrolysate de caséine	0,5 g/l
KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄	0,25 g/l

L'autoclavage du milieu se fait à 115°C pendant 30 minutes.

PRECULTURE

Des cubes de gélose portant du mycélium permettent de réaliser des précultures en fioles d'Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu L de ODDOUX liquide et des billes de verre. Ces fioles sont alors placées à 23°C jusqu'à ce qu'une croissance suffisante soit obtenue (7 à 10 jours). Ensuite la "galette" de mycélium est brisée par les billes de verre lors d'une agitation énergique de la fiole, jusqu'à obtention d'un homogénat.

ANNEXE I-1 (suite)

CULTURE

Des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml avec 50 ml de milieu L de ODDOUX liquide sont ensemencées avec 2 ml d'homogénat. Ces cultures sont placées à 25°C sur un agitateur va et vient possédant une amplitude de 10 cm et une fréquence de 80 allers/retours par minute.

DEUTEROMYCOTINESENTRETIEN DE SOUCHES

Les souches sont repiquées sur pente gélosée de milieu Malt-Agar (Difco) à une température de 23°C. La température de conservation est de 4°C.

Les conditions de culture sont sensiblement identiques à celles indiquées pour les Basidiomycotins. Les seules différences se situent au niveau de la composition du milieu nutritif et de la méthode d'ensemencement.

MILIEU

Le milieu minéral de base a été mis au point par MORQUER (1931), modifié par FAYRET (1975) et contient les éléments suivants :

KH_2PO_4	0,8	g/l
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	g/l
$\text{Ca}(\text{PO}_4\text{H}_2)_2, \text{H}_2\text{O}$	0,2	g/l
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,01	g/l
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	g/l
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,005	g/l
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,001	g/l

ANNEXE I-1 (suite)

La source azotée est fournie par de la L-asparagine monohydratée à raison de 1,13 g/l, quant au carbone il est apporté sous forme de glucose à 20 g/l. Ce milieu est autoclavé à 115°C pendant 30 minutes.

CULTURE

Ces champignons poussent plus rapidement que les Basidiomycotins, il est donc inutile de passer par le stade des précultures. Les fioles de culture sontensemencées avec des conidies ou des fragments mycéliens prélevés directement sur les pentes gélosées. Les conditions de culture sont identiques à celles décrites pour les Basidiomycotins.

CONDITIONS D'ECLAIREMENT

Dans le cas d'essais réalisés à la lumière, l'éclairage est réalisé par des tubes fluorescents blancs (MAZDA "lumière du jour de luxe") d'un flux lumineux de 2500 lux durant la croissance et la bioconversion.

ANNEXE I-2

CONDITIONS DE BIOCONVERSION

Après 3 jours de culture (conditions détaillées en annexe I-1), nous ajoutons stérilement dans chaque fiole de culture 2 ml d'une solution de substrat à 10 g/l dans l'acétone. Les fioles sont ensuite replacées à 25°C sur l'agitateur va et vient de 10 cm d'amplitude et de 80 allers/retours par minute de fréquence.

A compter de cette addition du substrat, les produits formés sont analysés toutes les 24 heures.

Chaque analyse est effectuée à partir d'une fiole : le mycélium est séparé du milieu par filtration sous vide puis le filtrat est acidifié jusqu'à pH 1 par HCl 6N.

Ensuite des parties aliquotes de 10 ml de filtrat sont extraites par l'éther éthylique.

Pour finir 100 µl d'extrait éthéré sont déposés sur plaque chromatographique suivant les indications données en annexe I-3.

ANNEXE I-3

ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE
SUR COUCHE MINCE

Les substrats et leurs produits sont mis en solution dans l'éther éthylique. Ces solutions de produits purs (ou les extraits étherés des filtrats de culture) sont déposés à la seringue.

Les plaques chromatographiques utilisées sont des plaques de 10 * 5 cm. L'adsorbant est constitué par du gel de silice (pores de 60 Å) additionné d'un indicateur de fluorescence : F254 (MERCK).

SYSTEMES DE SOLVANTS

- hexane/éther éthylique : 50/50 pour la benzophénone et ses dérivés hydroxylés.

- chloroforme/éther éthylique : 80/20 pour la 44' diméthoxybenzophénone et ses produits de O-déméthylation.

La lecture des plaques chromatographiques est effectuée sous une lampe UV à 254 nm.

ANNEXE I-4

MILIEU DE CULTURE UTILISE POUR
L'ETUDE SUR L'INFLUENCE DU
MILIEU

Ce milieu est dérivé d'un milieu mis au point par KIRK et coll. (1978) pour les études sur la biodégradation des lignines. C'est un milieu synthétique dont la composition est la suivante :

Glucose	10	g/l
Tartrate d'ammonium	2,45	g/l
KH ₂ PO ₄	2	g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5	g/l
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,1	g/l
Thiamine	1	mg/l
Solution d'oligoéléments	7	ml/l
Tampon acétate 10mM pH 4,5	500	ml/l

Solution d'oligoéléments

MgSO ₄ , 7H ₂ O	3	g/l
NaCl	1	g/l
MnSO ₄ , H ₂ O	0,5	g/l
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,1	g/l
CoCl ₂	0,1	g/l
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,1	g/l
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,1	g/l
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,01	g/l
AlK(SO ₄) ₂ , 12H ₂ O	0,01	g/l
H ₃ BO ₃	0,01	g/l
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,01	g/l

Ce milieu est préparé à partir de solutions mères stérilisées par filtration sur membrane Millipore 0,22 µm.

ANNEXE III-1

TECHNIQUES CULTURALES ET
BIOCONVERSION**ENSEMENCEMENT**

Pour obtenir une suspension de "spores", les conidies sont détachées de la pente gélosée de Malt-Agar (Difco) par une agitation vigoureuse du tube avec une solution de tween 20 à 0,01%.

Après comptage au microscope avec une cellule de Thoma, la concentration est ramenée à $2,5 \cdot 10^6$ spores/ml.

Les fioles d'Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture sontensemencées par 2 ml de cette suspension de spores.

MILIEU DE CULTURE

C'est le milieu minéral de base de MORQUER (1931) modifié par FAYRET (1975) et décrit en annexe I-1.

L'azote est apporté sous forme de L-asparagine monohydratée à la concentration de 1,13 g/l ; le glucose à 10 g/l constitue la source carbonée.

CROISSANCE ET BIOCONVERSION

Ces cultures sont placées à 25°C à l'obscurité sur un agitateur de type va et vient de 10 cm d'amplitude et de 80 allers/retours/min de fréquence.

Après 3 jours de culture, nous ajoutons stérilement 2 ml de substrat à 0,2 g/l dans l'acétone.

A intervalles de temps donnés, les fioles sont récoltées, une filtration sous vide sépare le mycélium du filtrat. Ce dernier est acidifié jusqu'à pH 1 avec HCl 6N.

Chaque essai est constitué de 3 échantillons.

ANNEXE III-2

DOSAGE HPLC :
CONDITIONS D'EXTRACTION ET
D'ANALYSE

CONDITIONS D'EXTRACTION

- Prélèvement d'une partie aliquote de 5 ml de milieu de culture (gamme d'étalonnage ou essai),
- Addition de 50 μ l de benzophénone à 400 mg/l dans le méthanol,
- Trois extractions successives par 5 ml d'éther éthylique,
- Une extraction par 5 ml de chloroforme,
- Assèchement de l'extrait chloroforme-éther par du Na_2SO_4 anhydre puis filtration,
- Elimination des solvants par évaporation sous vide,
- Reprise du résidu sec par 500 μ l de méthanol.

Cet extrait méthanolique est ensuite analysé par HPLC.

CONDITIONS D'ANALYSE EN HPLC

- Colonne : Hypersil-RP18 - 5 μ - 10cm
- Précolonne : Hypersil-RP18 - 5 μ - 15mm
- HPLC mode isocratique
 - * débit : 1ml/min (pompe LKB 2150)
 - * détection à 275 nm (détecteur LKB 2158)
- Solvant d'élution : méthanol à 57%
- Intégrateur : Hewlett-Packard 3392A
- Volume d'injection : 20 μ l par boucle d'injection

ANNEXE IV-1

MESURE DE LA CROISSANCE
MYCELIENNE

La croissance du champignon est suivie par mesure périodique du poids de matière sèche cellulaire.

Le champignon est recueilli par filtration sous vide sur papier filtre sans cendre (Durieux n°111), préalablement pesé, puis il est abondamment rincé à l'eau distillée.

L'ensemble est ensuite séché à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant.

ANNEXE IV-2

TRANSFORMATION DU SUBSTRAT PAR
DES
FILTRATS DE CULTURE

CAS D'ENZYMES CONSTITUTIFS

Les conditions de culture sont identiques à celles énoncées en annexe III-1, mais la concentration en glucose du milieu est de 2 g/l.

Après 3 jours de culture, une filtration stérile sépare le mycélium du filtrat. Le substrat est ensuite incorporé dans le seul filtrat de culture.

CAS D'ENZYMES INDUCTIBLES

Quelques cristaux de 44' diméthoxybenzophénone sont introduits dans le milieu de culture avant l'ensemencement du milieu.

La culture est ensuite conduite de la manière habituelle en appliquant la méthode ci-dessus pour l'addition du substrat.

EXTRACTION ET ANALYSE

Une partie aliquote de 10 ml de filtrat est extraite à l'éther éthylique. Le résidu sec obtenu après évaporation sous vide est repris par 2 ml de ce même éther.

L'analyse est réalisée par CCM : 100 μ l d'extrait étheré sont déposés sur plaques chromatographiques (Annexe I-3).

ANNEXE IV-3

MESURES DES ACTIVITES
ENZYMATIQUES

Les activités enzymatiques sont mesurées directement sur les filtrats de cultures. Les lectures sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre double faisceau KONTRON UVIKON 810. Les conditions opératoires sont résumées ci-dessous.

LACCASE

Mélange réactionnel :

- Filtrat de culture : 1 ml
- Syringaldazine
(1,6 mg/ml méthanol) : 10 μ l
- Tampon phosphate 100 mM pH 6 qsp 3 ml

La transformation de la syringaldazine en sa quinone est suivie à 526 nm à 30°C (GALLIANO, 1989).

LIGNINE-PEROXYDASE

Mélange réactionnel :

- Filtrat de culture : 1 ml
- Alcool vératrylique 12 mM : 100 μ l
- Tampon lactate 50 mM pH 3 : 1,88 ml
- H₂O₂ 15 mM : 20 μ l

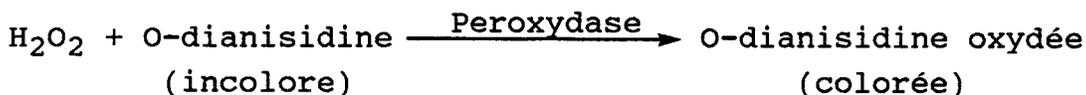
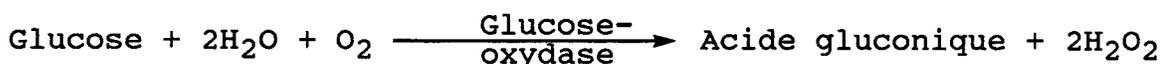
L'alcool vératrylique est oxydé en aldéhyde vératrylique. La lecture se fait à 310 nm à 37°C (COLOMBIÉ-BONO, 1990).

ANNEXE V

DOSAGE DU GLUCOSE PAR LA
GLUCOSE-OXYDASE

Nous avons utilisé le kit de dosage commercialisé par Sigma Diagnostics (U.S.A.).

Le principe de cette méthode repose sur le couplage des deux réactions enzymatiques suivantes :



La solution mixte "enzyme-réactif coloré" est préparée suivant les indications du fabricant : le contenu de la capsule d'enzymes (glucose-oxydase + peroxydase) est versé dans 100 ml d'eau distillée. Après dissolution, ce mélange est additionné de 1,6 ml d'une solution de O-dianisidine à 2,5 g/l.

Les filtrats de culture sont dilués pour avoir au maximum 3 g/l de glucose puis subissent une défécation par addition d'hydroxyde de baryum et de sulfate de zinc (1 ml d'hydroxyde de baryum + 1 ml de sulfate de zinc + 2 ml de filtrat).

Après centrifugation, on ajoute à 0,5 ml du surnageant 5 ml de solution mixte "enzyme-réactif coloré". Les tubes sont incubés 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière.

Les densités optiques sont lues à 450 nm par un spectrophotomètre KONTRON UVIKON 810.

La courbe étalon est établie avec des solutions de glucose de 0 à 3 g/l.

ANNEXE VI-1

LES CONDITIONS D'ÉCLAIREMENT**LUMIERE BLANCHE**

Les radiations sont émises par des tubes fluorescents de référence TF "blanc - lumière de jour de luxe" Mazda apportant environ 2000 lux. Les essais sont éclairés dès l'ensemencement et sont placés sur un agitateur va et vient dont l'amplitude est de 10 cm et la fréquence de 80 allers-retours par minute.

LUMIERE ULTRAVIOLETTE

Les tubes fluorescents (TFW N-Mazda) dispensent une lumière émettant dans le proche ultraviolet dite lumière de Wood ou lumière noire ($300 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$). Ces radiations correspondent à un flux lumineux dont les valeurs d'énergie se situent entre 130 et $230 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. L'agitateur va et vient utilisé possède une amplitude de 2 cm et une fréquence de 130 allers-retours par minute.

Dans les deux cas l'éclairage est permanent et les témoins "obscurité" sont réalisés en entourant les fioles de papier noir.

ANNEXE VI-2

CONDITIONS OPERATOIRES POUR
L'ETUDE DU pH

Les techniques d'ensemencement et de croissance sont identiques à celles décrites en annexe III-1, mais la bioconversion est effectuée dans des tampons de nature et de pH différents.

Après quatre jours de culture, le mycélium est récupéré par filtration stérile, lavé deux fois avec le tampon choisi et déposé dans des fioles contenant 50 ml de ce même tampon et 2 ml de 44' diméthoxybenzophénone à 0,2 g/l dans l'acétone.

Après ce transfert, l'expérience se déroule de nouveau suivant les conditions citées en annexe III-1 pour la fin de la bioconversion et en annexe IV-2 pour l'extraction et l'analyse.

ANNEXE VII-1

ADDITION DE SUBSTRAT EN COURS
DE
BIOCONVERSION

Les conditions de culture et de bioconversion sont décrites en annexe III-1. Trois séries de fioles sont préparées, la 44' diméthoxybenzophénone, à 0,2 g/l dans l'acétone, est ajoutée à raison de 2 ml par fiole.

Dans la 1ère série, une seule addition de substrat a lieu au temps $t = 0$ jour.

Les fioles de la 2ème série reçoivent du substrat aux temps $t = 0$ et $t = 1$ jour.

Dans la 3ème série, 3 additions de substrat sont réalisées aux temps $t = 0$, $t = 1$ et $t = 2$ jours.

ANNEXE VII-2

**MISE EN ROUTE D'UN TEST DE
RETROINHIBITION**

La procédure habituelle est utilisée (Annexe III-1) mais de la 44' dihydroxybenzophénone à diverses concentrations est ajoutée en même temps que le substrat.

Pour conserver le même pourcentage d'acétone, ces produits sont ajoutés à raison de 1 ml de solution mère de 44' dihydroxybenzophénone et 1 ml de solution de 44' diméthoxybenzophénone deux fois plus concentrée (0,4 g/l).

Les solutions mères du composé dihydroxylé sont à 0,4 , 2 et 6 g/l dans l'acétone : les concentrations finales dans le milieu de culture sont donc de 8 , 40 et 120 mg/l.

ANNEXE VIII-1

CONDITIONS UTILISEES EN
FERMENTEUR-COLONNE
DE TYPE "AIR-LIFT"

MILIEU DE CULTURE

Le milieu (Annexe III-1) est additionné d'antimousse silicone Rhodorsil 426 R à la concentration de 0,1 %.

PRECULTURE

La préculture est placée à 25°C à l'obscurité sur un agitateur de type va et vient de 10 cm d'amplitude et d'une fréquence de 80 allers-retours/min pendant 24 heures.

CONDITIONS DE FERMENTATION

Volume de milieu : 1,2 l

Température : 25°C

Débit d'air : 50 l/h

CONDITIONS DE BIOCONVERSION

Après trois jours de culture le substrat, dissous dans l'acétone, est ajouté à raison de 8 mg/l de milieu. Des prélèvements sont effectués régulièrement.

ANNEXE VIII-2

CONDITIONS UTILISEES EN
FERMENTEUR DE 2 LITRES
(SGI type SET 2)

MILIEU DE CULTURE

Le milieu de culture utilisé aussi bien pour la préculture que pour le fermenteur est décrit en annexe III-1.

PRECULTURE

La préculture est placée à 25°C à l'obscurité sur un agitateur de type va et vient de 10 cm d'amplitude et d'une fréquence de 80 allers-retours/min pendant 24 heures.

CONDITIONS DE FERMENTATION

Volume de milieu : 1,5 l
Température : 25°C
Vitesse d'agitation : 200 RPM
Débit d'air : 100 l/h

CONDITIONS DE BIOCONVERSION

Après trois jours de croissance, nous ajoutons le substrat dissous dans l'acétone à raison de 8 mg/l de milieu. Des prélèvements sont effectués à intervalles de temps réguliers.

ANNEXE VIII-3

CONDITIONS UTILISEES EN
FERMENTEUR DE 14 LITRES
(New-Brunswick CFS-314)

MILIEU DE CULTURE

Le milieu de culture utilisé aussi bien pour la préculture que pour le fermenteur est décrit en annexe III-1.

PRECULTURE

La préculture est placée à 25°C à l'obscurité sur un agitateur de type va et vient de 10 cm d'amplitude et d'une fréquence de 80 allers-retours/min pendant 24 heures.

CONDITIONS DE FERMENTATION

Volume de milieu : 10 l
Température : 25°C
Vitesse d'agitation : 50 RPM
Débit d'air : 250 l/h

CONDITIONS DE BIOCONVERSION

Après trois jours de croissance, le substrat, dissous dans l'acétone, est ajouté à raison de 8 mg/l de milieu. Des prélèvements sont effectués régulièrement.

ANNEXE VIII-4
IMMOBILISATION SUR TRAME DE
NYLON ET
CONDITIONS DE BIOCONVERSION

LE SUPPORT

Nous utilisons une trame de nylon souple (2,5 * 30 cm) peu serrée dont les fils forment des carrés de 1 mm de côté. Dans la colonne, la trame est retenue par un fil de nylon attaché à son extrémité supérieure. Un poids en verre est fixé à l'autre extrémité.

L'IMMOBILISATION

La trame de nylon est immergée dans une fiole d'Erlenmeyer de 1 litre contenant 500 ml de milieu de culture (Annexe III-1). L'ensemencement est réalisé grâce à 10 ml d'une suspension de spores. Cette fiole est placée à 25°C sur un agitateur de type va et vient dont l'amplitude est de 2 cm et la fréquence est de 60 allers-retours/min. Au bout de 3 ou 4 jours le mycélium a envahi la trame, elle est transférée, sous hotte à flux laminaire, de la fiole au fermenteur-colonne.

LA BIOCONVERSION

La 44' diméthoxybenzophénone, dissoute dans l'acétone, est ajoutée au milieu de bioconversion (voir texte) pour obtenir une concentration de 8 mg/l. Ce milieu est ensuite introduit dans le fermenteur-colonne.

LES PARAMETRES DE FERMENTATION

Volume de milieu : 1,2 l
Température : 25°C
Débit d'air : 100 l/h

ANNEXE VIII-5

MILIEU DE BIOCONVERSION UTILISE
LORS DE L'IMMOBILISATION
SUR TRAME DE NYLON.

Un milieu "pauvre" a été mis au point pour empêcher le développement mycélien et réaliser la bioconversion de la 44' diméthoxybenzophénone. Sa composition est la suivante :

KH_2PO_4	0,08 g/l
$\text{Ca}(\text{PO}_4 \text{ H}_2)_2, \text{H}_2\text{O}$	0,02 g/l
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g/l
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	1 mg/l
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg/l
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,5 mg/l
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 mg/l

L'azote et le carbone sont apportés par de la L-asparagine (monohydratée) à 0,113 g/l et du glucose à 0,5 g/l.

ANNEXE VIII-6

CONDITIONS UTILISEES POUR LA
COLONNE
AVEC ANNEAUX DE RASCHIG

LA COLONNE

La colonne (2,5 * 50 cm) est dotée d'une double enveloppe permettant de la thermostatier grâce à une circulation d'eau. Le garnissage est constitué d'anneaux de verre lisses appelés anneaux de Raschig (9 * 5 mm). Une pompe péristaltique (WATSON-MARLOW 502-S) assure la circulation du milieu.

LES MILIEUX DE CULTURE

Le milieu de croissance utilisé est décrit en annexe III-1, le milieu de bioconversion est le milieu "pauvre" utilisé lors de l'immobilisation sur trame de nylon (Annexe VIII-5).

L'IMMOBILISATION

Suivant la méthode de PARASCANDOLA et coll. (1987), elle est obtenue par circulation en continu, en flux descendant, d'une suspension de spores dans du tween 20 à 0,01 % avec un débit de 10 ml/min pendant 12 heures. Les anneaux ne sont pas immergés dans la suspension de spores, celle-ci percole au travers de la colonne. La fiole contenant la suspension de spores est ensuite remplacée par une autre contenant du milieu de croissance.

ANNEXE VIII-6 (suite)**LA CROISSANCE**

La colonne est remplie de milieu de croissance (fonctionnement en immersion), une alimentation en air est mise en place.

Température : 25°C

Débit d'air : 100 l/h

Après 3 jours de croissance la colonne est entièrement vidée puis le circuit réservé à la bioconversion est mis en service.

LA TRANSFORMATION

Le substrat, dissous dans l'acétone, a été ajouté au milieu de bioconversion à raison de 8 mg/l. Les conditions de température et de débit d'air sont celles utilisées pour la croissance.

Un fonctionnement en discontinu ("batch") a été retenu : après remplissage de la colonne par le milieu de bioconversion, la circulation est arrêtée. Les prélèvements sont effectués régulièrement.

ANNEXE VIII-7

TRANSFORMATION EN MILIEU
ORGANIQUE PAR DU
MYCELIUM FRAIS

Le matériel fongique est obtenu en fioles d'Erlenmeyer dans les conditions habituelles (Annexe III-1).

Après 3 jours de croissance, les "pellets" sont récoltés par filtration sous vide puis lavés trois fois de suite avec le milieu qui doit être testé. La concentration en substrat des différents milieux est de 0,2 g/l. Des prélèvements sont réalisés toutes les 24 heures pendant 96 heures.

Les milieux testés sont l'acétone pure, l'acétone à 10, 25, 50 ou 75 % dans l'eau, et le mélange MTBE/Acétone : 50/50.

MTBE = Méthyl Tertio Butyl Ether.

ANNEXE VIII-8

**MISE EN OEUVRE DE POUDRE
ACETONIQUE****PREPARATION DE LA POUDRE ACETONIQUE (GUNSALUS, 1955)**

Les "pellets" sont issus d'une culture en fermenteur. Les opérations suivantes sont effectuées en chambre froide.

Après lavage, les "pellets" sont mis en suspension dans du tampon tris-maléate 50 mM (pH 5,5) puis broyés. Cet homogénat est versé dans 10 volumes d'acétone à -15°C sous agitation vigoureuse.

Après 10 minutes d'agitation, l'acétone est éliminée par filtration sous vide. Le mycélium essoré, est lavé avec deux fois 3 volumes d'acétone à -15°C puis filtré sous vide jusqu'à élimination la plus complète de l'acétone. Le résidu est séché sur papier filtre puis sous un courant d'azote. Il est ensuite stocké dans un dessiccateur.

ESSAI DE TRANSFORMATION DE LA 44' DIMETHOXYBENZOPHENONE

L'essai est réalisé en plaçant 100 mg de poudre acétonique soit dans 50 ml de milieu (Annexe III-1), soit dans 50 ml de tampon tris-maléate 50 mM à pH 5,5. Le substrat, à 0,2 g/l dans l'acétone, est ajouté à raison de 2 ml par fiole.

ANNEXE VIII-9

**MISE EN OEUVRE DE MYCELIUM
LYOPHILISE****PREPARATION DU MYCELIUM**

Deux types de mycélium lyophilisé ont été testés : un qui a été en contact avec la 44' diméthoxybenzophénone au cours de la fermentation, l'autre qui ne l'a pas été. Ces mycéliums sont soit utilisés tels quels soit lavés à l'éther éthylique soit réduits en poudre dans un mortier.

ESSAI DE TRANSFORMATION

Le test est effectué avec 300 mg de mycélium lyophilisé dans 30 ml de milieu organique contenant 1 ou 10 mg de 44' diméthoxybenzophénone. Le milieu organique est constitué de méthyl tertio butyl éther (MTBE) avec 15 % d'acétone. Dans certains essais, 500 μ l d'eau sont ajoutés. La moitié des essais est placée sous atmosphère d'oxygène, l'autre moitié reste sous atmosphère d'air.

Des témoins en milieu aqueux sont également réalisés avec 500 mg de mycélium lyophilisé dans 50 ml de tampon tris-maléate 50 mM à pH 5,5 additionnés de 2 ml d'une solution acétonique de 44' diméthoxybenzophénone à 0,2 g/l.

ANNEXE IX

LES SYSTEMES DE SOLVANTSAnisole, vératrole et 1,4 diméthoxybenzèneCHCl₃ / Acétate d'éthyle : 90 / 10Acide féruliqueCHCl₃ / Ether éthylique / Acide acétique : 8 / 2 / 1Acide anisyliqueCHCl₃ / Méthanol / Acide acétique : 19 / 1 / 1Trans-anéthole et 4 méthoxystilbèneCHCl₃ / Ether éthylique : 90 / 104 méthoxy-acétophénone et 4' méthoxychalconeCHCl₃ / Ether éthylique : 80 / 20AnisoïneCHCl₃ / Ether éthylique : 50 / 50

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDEL-RAHIM A.M. and ARBAB H.A., 1985 - Nutrient requirements in germination of conidiospores of *Aspergillus niger*. *Mycopathologia*, **92**:111-114.
- ABRAHAM T.E., JAMUNA R., VIJAY BANSILAL C and RAMAKRISHNA S.V., 1991 - Continuous synthesis of glucoamylase by immobilized fungal mycelium of *Aspergillus niger*. *Starch Staerke*, **43**:113-116.
- AGARWALA S.C., CHATTERJEE C., NAUTIYAL N. and SHARMA C.P., 1986a - Molybdenum nutrition of isolates of four *Aspergillus* species. *Can. J. Microbiol.*, **32**:557-561.
- AGARWALA S.C., NAUTIYAL N. and CHATTERJEE C., 1986b - Iron nutrition of four *Aspergillus* species. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **86**:561-570.
- AMBIKE S.H. and BAXTER R.M., 1970 - Cytochrome P-450 and b5 in *Claviceps purpurea* : interconversion of P-450 and P-420. *Phytochem.*, **9**:1959-1962.
- AMIN B., GUPTA C. and GEORGE U., 1985 - Factors affecting production and activity of *Polyporus hirsutus* laccase. *Indian J. Exp. Biol.*, **23**:273-275.
- ANDER P., ERIKSSON M.E.R. and ERIKSSON K.-E., 1985 - Methanol production from lignin-related substances by *Phanerochaete chrysosporium*. *Physiol. Plant.*, **65**:317-321.

- ANDRAWIS A. and KAHN V., 1985 - Inactivation of mushroom tyrosinase by hydrogen peroxide. *Phytochem.*, 24:397-405.
- ARST Jr H.N. and BAILEY C.R., 1977 - The regulation of carbon metabolism in *Aspergillus nidulans*. In "**Genetics and Physiology of *Aspergillus***", pp 131-146. Smith J.E. and Pateman J.A. eds., Academic Press, London - New-York - San Francisco.
- ASTHER M., CAPDEVILA C. and CORRIEU G., 1988 - Control of lignin-peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 by temperature shifting. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:3194-3196.
- ASTHER M., CORRIEU G., DRAPON R. and ODIER E., 1987 - Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme Microb. Technol.*, 9:245-249.
- BAIG M.A., 1987 - Calcium gluconate fermentation of maize gur (hydrol) in stirred 50 liter fermenter. *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, 30:942-944.
- BAKLASHOVA T.G. and KOSHCHEENKO K.A., 1980 - Effect of detergents on the hydroxylation of indolyl-3-acetic acid by the culture of *Aspergillus niger*. *Mikrobiologiya*, 49:546-550.
- BAKLASHOVA T.G., KOSHCHEENKO K.A. and SKRYABIN G.K., 1984 - Hydroxylation of indolyl-3-acetic acid by immobilized mycelium of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19:217-223.
- BARRIOS GONZALEZ J. and ANAYA S., 1987 - Development of a system to study spore germination in *Aspergillus niger*. *Rev. Mex. Micol.*, 3:9-18.
- BENVENISTE I., SALAÜN J.P. and DURST F., 1978 - Phytochrome-mediated regulation of a monooxygenase hydroxylating cinnamic acid in etiolated pea seedlings. *Phytochem.*, 17:359-363.
- BERRY D.R., 1975 - The environmental control of the physiology of filamentous fungi. In "**The Filamentous Fungi. Vol. I. Industrial Mycology**", pp 16-32. Smith J.E. and Berry D.R. eds., Edward Arnold, London.
- BERRY D.R., CHMIEL A. and Al OBAIDI Z., 1977 - Citric acid production by *Aspergillus niger*. In "**Genetics and Physiology of *Aspergillus***", pp 405-426. Smith J.E. and Pateman J.A. eds., Academic Press, London - New-York - San Francisco.
- BERTRAND D. et DE WOLF A., 1960 - Croissance de l'*Aspergillus niger* en présence de chélateurs. *C. R. Acad. Sci.*, 250:1543-1545.

- BLANK-KOBLENC T., TOR R. and FREEMAN A., 1988 - Cosolvent effects on gel-entrapped oxidoreductase : the glucose oxidase model. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 10:32-41.
- BOCKS S.M., 1967 - Fungal metabolism. III - The hydroxylation of anisole, phenoxyacetic acid, phenylacetic acid and benzoic acid by *Aspergillus niger*. *Phytochem.*, 6:785-789.
- BOCKS S.M., LINDSAY SMITH J.R. and NORMAN R.O.C., 1964 - Hydroxylation of phenoxyacetic acid and anisole by *Aspergillus niger* (Van Tiegh.). *Nature*, 201:398.
- BOLLAG J.M. and LIU S.Y., 1972 - Hydroxylations of carbaryl by soil fungi. *Nature*, 236:177-178.
- BOLWELL G.P. and BUTT V.S., 1983 - Photoinduced changes in o-diphenol oxidase and p-coumarate hydroxylase activities in spinach beet seedlings and leaves. *Phytochem.*, 22:37-45.
- BOUIX M. et LEVEAU J.-Y., 1984 - Production des enzymes d'origine microbienne. In "Biotechnologie" 2^e édition, pp 281-290. Scriban R. (Coord.), Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- BOYER R.F., MASCOTTI D.P. and SCHORI B.E., 1986 - Ferroxidase activity of mushroom tyrosinase. *Phytochem.*, 25:1281-1283.
- BUKHAR M.I., VDOVINA N.V., KRASNOVA L.A., and KOSHCHEENKO K.A., 1980 - The study on the effect of surfactants on the hydroxylating activity of *Tieghemella orchidis* cells in free and immobilized states. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 16:503-510.
- CARLEY H.E., WATSON R.D. And HUBER D.M., 1967 - Inhibition of Pigmentation in *Aspergillus niger* by dimethylsulfoxide. *Can. J. Bot.*, 45:1451-1453.
- CEEN E.G., HERRMANN J.P.R. and DUNNILL P., 1987 - Solvent damage during immobilized cell catalysis and its avoidance : studies of 11 α -hydroxylation of progesterone by *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25:491-494.
- CERNIGLIA C.E. and GIBSON D.T., 1978 - Metabolism of naphthalene by cell extracts of *Cunninghamella elegans*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 186:121-127.
- CERNIGLIA C.E. and GIBSON D.T., 1979 - Oxidation of benzo(a)pyrene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *J. Biol. Chem.*, 254:12174-12180.

- CERNIGLIA C.E., MAHAFFEY W. and GIBSON D.T., 1980 - Fungal oxidation of benzo(a)pyrene : formation of (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene by *Cunninghamella elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**:226-232.
- CHEBOTAREV L.N. and NUSHTAEVA T.I., 1990 - Stimulation of *Saccharomyces carlsbergensis* growth by finely dispersed metal iron. *Mikrobiologiya*, **59**:59-62.
- CHEN B.C., 1988 - Studies on mutant strain for overproduction of glucoamylase and its properties. "Biotechnology and food industry", Proceedings of the International Symposium, Budapest, Hungary, October, 5-9, 1987.
- CHMIEL A., 1987 - Oxygen limitation in citric acid biosynthesis by *Aspergillus niger* with the high mycelium density. *Acta Microbiol. Pol.*, **35**:321-324.
- CHUNG B.H., CHANG H.N. and KIM I.H., 1987 - Rifamycin B production by *Nocardia mediterranei* immobilized in a dual hollow fibre bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**:345-349.
- CLIFFORD D.R. and WOODCOCK D., 1964 - Metabolism of phenoxyacetic acid by *Aspergillus niger* Van Tiegh. *Nature*, **203**:763.
- COCHRANE V.W., 1958 - *Physiology of Fungi*. Wiley J. and Sons Inc., New-York.
- COLOMBIÉ-BONO F., 1990 - Aspects physiologiques de la production de lignine-peroxydases par *Phanerochaete chrysosporium*. Thèse de Doctorat d'Université, Biol. et Technol. Vég, Toulouse.
- COX J.C. and GOLBECK J.H., 1985 - Hydroxylation of biphenyl by *Aspergillus parasiticus* : approaches to yield improvement in fermenter cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **27**:1395-1402.
- CRAWFORD R.L., MC COY E., HARKIN J.M., KIRK T.K. and OBST J.R., 1973 - Degradation of methoxylated benzoic acids by a *Nocardia* from a lignin-rich environment : significance to lignin degradation and effect of chloro substituents. *Appl. Microbiol.*, **26**:176-184.
- DAWSON M.W., MADDOX I.S. and BROOKS J.D., 1986 - Effects of interruptions to the air supply on citric acid production by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.*, **8**:37-40.
- DEO Y.M. and GAUCHER G.M., 1983 - Semi-continuous production of the antibiotic patulin by immobilized cells of *Penicillium urticae*. *Biotechnol. Lett.*, **5**:125-130.

- DMOCHEWITZ S. and BALLSCHMITER K., 1988 - Microbial transformation of technical mixtures of polychlorinated biphenyls (PCB) by the fungus *Aspergillus niger*. *Chemosphere*, 17:111-122.
- DODGE R.H., CERNIGLIA C.E. and GIBSON D.T., 1979 - Fungal metabolism of biphenyl. *Biochem. J.*, 178:223-230.
- DUTTA D., GHOSH D.K., MISHRA A.K. and SAMANTA T.B., 1983 - Induction of benzo(a)pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS : evidences of multiple forms of cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115:692-699.
- EIKMEIER H. and REHM H.J., 1984 - Production of citric acid with immobilized *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20:365-370.
- EIKMEIER H. and REHM H.J., 1987 - Stability of calcium-alginate during citric acid production of immobilized *Aspergillus niger*. *Appl. Microb. Biotechnol.*, 26:105-111.
- ELMAYERGI H., SCHARER J.M. and MOO-YOUNG M., 1973 - Effects of polymer additives on fermentation parameters in a culture of *A. niger*. *Biotechnol. Bioeng.*, 15:845-859.
- FAN L.-S., FUJIE K., LONG T.-R. and TANG W.-T., 1987 - Characteristics of draft tube gas-liquid-solid fluidized-bed bioreactor with immobilized living cells for phenol degradation. *Biotechnol. Bioeng.*, 30:498-504.
- FAULKNER J.K. and WOODCOCK D., 1968 - The metabolism of phenylacetic acid by *Aspergillus niger*. *Phytochem.*, 7:1741-1742.
- FAYRET J., 1975 - Etude du cycle de reproduction du *Gnomonia leptostyla*. Déterminisme et physiologie. Thèse de Doctorat en Sciences Naturelles, Toulouse n°689.
- FERRIS J.P., MAC DONALD L.H., PATRIE M.A. and MARTIN M.A., 1976 - Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the fungus *Cunninghamella bairdii* : evidence for the presence of cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.*, 175:443-452.
- FRIEDRICH J., CIMERMAN A. and STEINER W., 1989 - Submerged production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger* : effect of different aeration/agitation regimes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 490-494.
- FRIES N., 1943 - Vitamin B1, vitamin B6 and biotin as growth substances for some ascomycetes. *Nature*, 152:105.
- GALBRAITH J.C. and SMITH J.E., 1969 - Filamentous growth of *Aspergillus niger* in submerged shake culture. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 52:237-246.

- GALLIANO H., 1989 - Biodégradation des lignines d'Hévéa par *Rigidoporus lignosus* : facteurs actifs et enzymes impliquées. Thèse de Doctorat d'Université, Biol. et Technol. Vég., Toulouse n°428.
- GANCET C. et GUIGNARD C., 1986 - Hydrolyse et synthèse de liaison ester par la lipase d'un mycélium dévitalisé de *Rhizopus arrhizus* en milieu non aqueux. *Rev. Fr. Corps Gras*, 11:423-430.
- GBEWONYO K. and WANG D.I.C., 1983a - Confining mycelial growth to porous microbeads : a novel technique to alter the morphology of non-newtonian mycelial cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 25:967-983.
- GBEWONYO K. and WANG D.I.C., 1983b - Enhancing gas-liquid mass transfer rates in non-newtonian fermentations by confining mycelial growth to microbeads in a bubble column. *Biotechnol. Bioeng.*, 25:2873-2887.
- GHOSH D.K., DUTTA D., SAMANTA T.B. and MISHRA A.K., 1983 - Microsomal benzo(a)pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS : assay and characterization of the enzyme system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113:497-505.
- GOLBECK J.H. and COX J.C., 1984 - The hydroxylation of biphenyl by *Aspergillus toxicarius* : conditions for a bench scale fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.*, 26:434-441.
- GOLBECK J.H., ALBAUGH S.A. and RADMER R., 1983 - Metabolism of biphenyl by *Aspergillus toxicarius* : induction of hydroxylating activity and accumulation of water-soluble conjugates. *J. Bacteriol.*, 156:49-57.
- GOLD M.H., KUWAHARA M., CHIU A.A. and GLENN J.K., 1984 - Purification and characterization of an extracellular H₂O₂-requiring diarylpropane oxygenase from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 234:353-362.
- GOLDMAN G.H., PELEGRINELLI FUNGARO M.H. and DE AZEVEDO J.L., 1988 - The evaluation of the cellulolytic activity in some strains of *Aspergillus niger* group. *Rev. Microbiol.*, 19:438-441.
- GOMEZ R., SCHNABEL I. and GARRIDO J., 1985 - Regeneration of *Aspergillus niger* 44 : study of different sporulation media. *Microbiol. Esp.*, 38:11-18.
- GOMEZ R., SCHNABEL I. and GARRIDO J., 1988 - Pellet growth and citric acid yield of *Aspergillus niger* 110. *Enzyme Microb. Technol.*, 10:188-191.

- GOMMERS P.J.F., CHRISTOFFELS L.P., KUENEN J.G. and LUYBEN K.C.A.M., 1986 - Gas-phase influence on the mixing in a fluidized bed bio-reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25:1-7.
- GOMOIU I., 1987 - The influence of some biological and physical factors on amylase production in 4 wild and mutant strains of *Aspergillus niger*. *Stud. Cercet. Biol. Ser. Biol. Veg.*, 39:68-72.
- GONZALEZ H.H.L., RESNIK S.L. and VAAMONDE G., 1987 - Influence of inoculum size on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentine corn. *Int. J. Food Microbiol.*, 4:111-118.
- GUNSALUS I.C., 1955 - Extraction of enzymes from microorganisms (Bacteria and Yeast). In "**Methods in Enzymology**", Vol.1, pp 51-62. Colowick S.P. and Kaplan N.O. ed., Academic Press Inc., New-York.
- HAARS A., TAUTZ D. and HÜTTERMANN A., 1986 - Bioconversion of organosoluble lignins by different types of fungi. *Resources and Conservation*, 13:37-51.
- HAMAMCI H. and HANG Y.D., 1989 - Production of citric acid by immobilized dried reactivated *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Tech.*, 3:51-54.
- HAMDI M., KHADIR A. and GARCIA J.-L., 1991 - The use of *Aspergillus niger* for the bioconversion of olive mill waste-waters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34:828-831.
- HASHEM A.R., 1989 - Effet of copper on the growth of *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus stolonifer*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.*, 30:111-120.
- HAWKER L.E., 1950 - **Physiology of Fungi**. University of London Press, London.
- HENDERSON M.E.K., 1961 - The metabolism of aromatic compounds related to lignin by some Hyphomycetes and yeast-like fungi of soil. *J. Gen. Microbiol.*, 26:155-165.
- HILL A.C. and RHODES M.J.C., 1975 - The properties of cinnamic acid 4-hydroxylase of aged swede root disks. *Phytochem.*, 14:2387-2391.
- HOCKERTZ S., SCHMID J. and AULING G., 1987 - A specific transport system for manganese in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.*, 133:3513-3520.
- HOFFMANN J.J., PUNNAPAYAK H., JOLAD S.D., BATES R.B. and CAMOU F.A., 1988 - Bioconversion of grindelic acid into 3 α -hydroxygrindelic acid. *J. Nat. Prod. (Lloydia)*, 51:125-128.

- HOLLAND H.L., BERGEN E.J., CHENCHIAH P.C., KHAN S.H., MUNOZ B., NINNISS R.W. and RICHARDS D., 1987 - Side chain hydroxylation of aromatic compounds by fungi. I - Products and stereochemistry. *Can. J. Chem.*, **65**:502-507.
- HONECK H., SCHUNCK W.-H. and MÜLLER H.-G., 1985 - The function of cytochrome P-450 in fungi and prospects of application. *Pharmazie*, **40**:221-227.
- HONECKER S., BISPING B., ZHU YANG and REHM H.J., 1989 - Influence of sucrose concentration and phosphate limitation on citric acid production by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**:17-24.
- HORITSU H., TAKAHASHI Y., ADACHI S., XIOA R., HAYASHI T. and KAWAI K., 1988 - Production of organic acids by immobilized cells of fungi. In "**Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells : Fundamentals and Applications**", pp 287-300. Moo-Young M. ed, Elsevier Science Publishers Ltd., Essex - New-York.
- HUGUES B., DAVIS G.M. and SPENCER I.M., 1988 - Lipase and esterase activities during microcycle growth of *Aspergillus niger*. *Biochem. Soc. Trans.*, **16**:790-791.
- INADA Y., NISHIMURA H., TAKAHASHI K., YOSHIMOTO T., RANJAN SAHA A. and SAITO Y., 1984 - Ester synthesis catalyzed by polyethylene glycol- modified lipase in benzene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**:845-850.
- INOUE Y., RHEE H.I., WATANABE K., MURATA K. and KIMURA A., 1987 - Metabolism of 2-ketoaldehydes in mold : purification and characterization of glyoxalase I from *Aspergillus niger*. *J. Biochem. (Tokyo)*, **102**:583-590.
- ISHIHARA T., 1980 - The role of laccase in lignin biodegradation. In "**Lignin Biodegradation : Microbiology Chemistry and Potential Applications. Vol. II**", pp 17-31. Kirk T.K., Higuchi T. et Chang H.M. eds., CRC Press, Boca Raton - Florida.
- JAMALUDDIN M., SUBBA RAO P.V. and VAIDYANATHAN C.S., 1970 - Involvement of the protocatechuate pathway in the metabolism of mandelic acid by *Aspergillus niger*. *J. Bacteriol.*, **101**:786-793.
- JERNEJC K., VENDRAMIN M. and CIMERMAN A., 1989 - Lipid composition of *Aspergillus niger* in citric acid accumulating and nonaccumulating conditions. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**:452-456.
- JOHNSON G.T. and GOULD B.S., 1953 - Pigment production in certain of the *Aspergillus glaucus* group. *Mycologia*, **45**:172-193.

- JONES A., BERK D., LESSER B.H., BEHIE L.A. and GAUCHER G.M., 1983 - Continuous production of patulin by immobilized cells of *Penicillium urticae* in a stirred tank reactor. *Biotechnol. Lett.*, 5:785-790.
- KAPOOR M. and LIN W.S., 1984 - Studies on the induction of aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase in *Neurospora crassa*, and its suppression by sodium selenite. *Xenobiotica*, 14:903-916.
- KARHOOT J.M., ANDERSON J.G. and BLAIN J.A., 1987 - Production of penicillin by immobilized films of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Lett.*, 9:471-474.
- KAZNACHEEV I.V., GUMARGALIEVA K.Z. and MOISEEV Y.V., 1986 - Adhesion of *Aspergillus niger* conidia to various polymer surfaces. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 291:1241-1244.
- KERNS G., OKUNEV O.N., ANANIN V.M. and GOLOVLEV E.L., 1987 - Enhanced formation of β -glucosidase by *Aspergillus niger* VKMF-2092 in fed-batch operation with frequently intermittent glucose addition. *Acta Biotechnol.*, 7:535-545.
- KIESLICH K., 1976 - **Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds**. Georg Thieme Publishers, Stuttgart.
- KIM J.H., OH D.K., PARK S.K., PARK Y.H. and WALLIS D.A., 1986 - Production of penicillin in a fluidized-bed bioreactor using a carrier-supported mycelial growth. *Biotechnol. Bioeng.*, 28:1838-1844.
- KIRK T.K. and LORENZ L.F., 1974 - Oxygenation of 4-alkoxyl groups in alkoxybenzoic acids by *Polyporus dichrous*. *Appl. Microbiol.*, 27:360-367.
- KIRK T.K., SCHULTZ E., CONNORS W.J., LORENZ L.F. and ZEIKUS J.G., 1978 - Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.*, 117:277-285.
- KLUGE M., KLEIN J. and WAGNER F., 1982 - Production of 6-aminopenicillanic acid by immobilized *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol. Lett.*, 4:293-296.
- KOHMOTO K., NISHIMURA S. and HIROE I., 1970 - Pathochemical studies on *Rhizoctonia* disease. I - Meta-hydroxylation of phenylacetic acid by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 60:1025-1026.
- KOPP B. and REHM H.J., 1984 - Semicontinuous cultivation of immobilized *Claviceps purpurea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19:141-145.

- KOSHCHEENKO K.A., BAKLASHOVA T.G., KOZLOVSKY A.G., ARINBASAROV M.U. and SKRYABIN G.K., 1977 - Hydroxylation of indolyl-3-acetic acid by *Aspergillus niger* IBPhM F-212. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 13:248-253.
- KREN V. , LUDVIK J., KOFRONOVA O., KOZOVA J. and REHACEK Z., 1987 - Physiological activity of immobilized cells of *Claviceps fusiformis* during long-term semicontinuous cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26:219-226.
- KUMAR A.A., VAIDYANATHAN C.S. and RAO N.A., 1978 - Mechanism of aromatic hydroxylation : the kinetic mechanism and the involvement of superoxide anions in the reaction catalyzed by m-hydroxybenzoate-4-hydroxylase from *Aspergillus niger* (UBC-814). *Indian J. Biochem. Biophys.*, 15:5-13.
- KURT M., DUNN I.J. and BOURNE J.R., 1987 - Biological denitrification of drinking water using autotrophic organisms with H₂ in a fluidized-bed biofilm reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 29:493-501.
- KUYUMDJIEVA A.V., SAVOV V.A., ATEV A.P. and PANAYOTOV H.A., 1987 - Investigating *Aspergillus niger* strain A₃, the producer of cellulase and hemicellulase enzymes in a nitrogen-limited hemostat : influence of the limitation on some enzymes of carbon metabolism. *C.R. Acad. Bulg. Sci.*, 40:77-80.
- de LABORDE de MONPEZAT T., 1990 - Production de lipases fongiques spécifiques : étude par fluorimétrie. Thèse de Doctorat d'Université, Biol. et Technol. Vég., Toulouse.
- LABOREY F. et LAVOLLAY J., 1967 - Sur la toxicité exercée par Zn²⁺ et Cd²⁺ dans la croissance d'*Aspergillus niger* l'antagonisme de ces ions et l'interaction Mg²⁺-Zn²⁺-Cd²⁺. *C. R. Acad. Sci., Sér. D*, 264:2937-2940.
- LAMB C.J. and RUBERY P.H., 1976a - Photocontrol of chlorogenic acid biosynthesis in potato tuber discs. *Phytochem.*, 15:665-668.
- LAMB C.J. and RUBERY P.H., 1976b - Differential effects of cycloheximide on the activity of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic acid 4-hydroxylase in light- and dark- incubated potato tuber discs. *Plant Sci. Lett.*, 7:33-37.
- LEACH C.M., 1971 - A practical guide to the effects of visible and ultraviolet light on fungi. In "Methods in Microbiology. Vol. 4", pp 609-664. Booth ed., Academic Press, London - New-York.

- LEE Y.H., LEE C.W. and CHANG H.N., 1989 - Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on polyurethane foam. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30:141-143.
- LEGISA M. and KIDRIC J., 1989 - Initiation of citric acid accumulation in the early stages of *Aspergillus niger* growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31:453-457.
- LEISOLA M., THANEI-WYSS U. and FIECHTER A., 1985 - Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.*, 3:97-107.
- LEUCHTENBERGER A., MAYER G. and RUTTLOFF H., 1990 - Pectinase synthesis by aggregated and filamentous mycelium of different *Aspergillus niger* mutants. *Zentralbl. Mikrobiol.*, 145:167-170.
- LI G.-X., LINKO Y.-Y. and LINKO P., 1984 - Glucoamylase and α -amylase production by immobilized *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.*, 6:645-650.
- LILLY V.G. and BARNETT H.L., 1951 - *Physiology of the Fungi*. Mc Graw-Hill Publications, New-York.
- LINKO Y.Y., LEISOLA M., LINDHOLM N., TROLLER J., LINKO P. and FIECHTER A., 1986 - Continuous production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.*, 4:283-291.
- LIPAVSKA H., VODICKA L., BURDA J., TRISKA J., KRUMPHANZL V., VANEK Z. and PODOJIL M., 1982 - The screening of microorganisms for hydroxylation activity : hydroxylation of diamantanols. *Biotechnol. Lett.*, 4:563-566.
- LIVERNOCHE D., JURASEK L., DESROCHERS M. and DORICA J., 1983 - Removal of color from kraft mill wastewaters with cultures of white-rot fungi and with immobilized mycelium of *Coriolus versicolor*. *Biotechnol. Bioeng.*, 25:2055-2065.
- MALDONADO M.C., STRASSER DE SAAD A.M. and CALLIERI D.A., 1989 - Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger*. *Sci. Aliments*, 9:101-110.
- MALFAIT J.L., WILCOX D.J., MERCER D.G. and BARKER L.D., 1981 - Cultivation of a filamentous mold (*Monascus purpureus*) in a glass pilot-scale airlift fermentor. *Biotechnol. Bioeng.*, 23:863-878.
- MARBACH I., HAREL E. and MAYER A.M., 1983 - Inducer and culture medium dependent properties of extracellular laccase from *Botrytis cinerea*. *Phytochem.*, 22:1535-1538.

- MAREK E., KOERNER D. and VON LUPIN I., 1988 - The influence of fermentation conditions on the synthesis of pectinolytic enzymes by an immobilized culture of *Aspergillus niger*. "Biotechnology and food industry", Proceedings of the International Symposium, Budapest, Hungary, October, 5-9, 1987.
- MARKWELL J., FRAKES L.G., BROTT E.C., OSTERMAN J. and WAGNER F.W., 1989 - *Aspergillus niger* mutants with increased glucose oxydase production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30:166-169.
- MARTIN J.F. and DEMAIN A.L., 1978 - Fungal development and metabolite formation. In "The Filamentous Fungi. Vol. III. Developmental Mycology", pp 426-450. Smith J.E. and Berry D.R. eds., Edward Arnold, London.
- MATTHEWS D.E. and VAN ETTEN H.D., 1983 - Detoxification of the phytoalexin pisatin by a fungal cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.*, 224:494-505.
- METWALLY M., ELSAYED M., OSMAN M., HANEGRAAF P.P.F., STOUTHAMER A.H. and VAN VERSEVELD H.W., 1991 - Bioenergetic consequences of glucoamylase production in carbon-limited chemostat cultures of *Aspergillus niger*. *Antonie leeuwenhoek*, 59:35-44.
- MILSTEIN O., TROJANOWSKI J., GRESSEL J. and HÜTTERMANN A., 1984 - Biodegradation of ¹⁴C-labeled synthetic lignin polymer by *Aspergillus-ssp*. *Microbios Lett.*, 25:99-100.
- MILSTEIN O., VERED Y., SHRAGINA L., GRESSEL J., FLOWERS H.M. and HÜTTERMANN A., 1983 - Metabolism of lignin related aromatic compounds by *Aspergillus japonicus*. *Arch. Microbiol.*, 135:147-154.
- MINAMIKAWA T., YOSHIDA S., HASEGAWA M., KOMAGATA K. and KATO K., 1972 - Microbial degradation of bergenin, a phenolic C-glucoside. *Agr. Biol. Chem.*, 36:773-778.
- MITARD A., 1987 - Influence des contraintes de cisaillement sur la croissance des champignons filamenteux. Etude d'*Aspergillus niger* ATCC 26036. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique, Génie Chimique, Toulouse.
- MOO-YOUNG M., HALARD B., ALLEN D.G., BURRELL R. and KAWASE Y., 1987 - Oxygen transfer to mycelial fermentation broths in an airlift fermentor. *Biotechnol. Bioeng.*, 30:746-753.
- MORESI M., 1981 - Optimal design of airlift fermenters. *Biotechnol. Bioeng.*, 23:2537-2560.

- MORQUER R., 1931 - Recherches morphogénétiques sur le *Dactylium macrosporum*. Thèse de Doctorat ès-Sciences, Toulouse.
- MOSHER W.A., SAUNDERS D.H., KINGERY L.B. and WILLIAMS R.J., 1936 - Nutritional requirements of the pathogenic mold *Trichophyton interdigitale*. *Plant Physiol.*, 11:795-806.
- MULDER E.G., 1948 - Importance of molybdenum in the nitrogen metabolism of microorganisms and higher plants. *Plant and Soil*, 1:94-119.
- MURPHY G. and LYNEN F., 1975 - Patulin biosynthesis : the metabolism of m-hydroxybenzyl alcohol and m-hydroxybenzaldehyde by particulate preparations from *Penicillium patulum*. *Eur. J. Biochem.*, 58:467-475.
- MURPHY G., VOGEL G., KRIPPAHL G. and LYNEN F., 1974 - Patulin biosynthesis : the role of mixed-function oxidases in the hydroxylation of m-cresol. *Eur. J. Biochem.*, 49:443-455.
- NAGAMOTO H., YASUDA T. and INOUE H., 1986 - Effect of organic solvents on the activity of glucoamylase. *Biotechnol. Bioeng.*, 28:1172-1177.
- NAUTIYAL N., CHATTERJEE C. and AGARWALA S.C., 1988 - Iron-molybdenum interaction in *Aspergillus niger*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 90:91-96.
- ODDOUX L., 1957 - Recherche sur les mycéliums secondaires des Homobasidiés en culture pure. Thèse de Docteur d'Etat en Pharmacie, Lyon.
- OUAZZANI J., ARSENIYADIS S., ALVAREZ-MANZANEDA R., RUMBERO A. and OURISSON G., 1991 - Microbial hydroxylations of further octalin derivatives. *Tetrahedron Lett.*, 32:1983-1986.
- PARASCANDOLA P., SCARDI V. and TARTAGLIONE O., 1987 - Immobilization of yeast cells by adhesion on tuff granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26:507-510.
- PARK H.E. and KIM M.N., 1989 - Bioconversion of progesterone by immobilized *Aspergillus phoenicis*. *Korean J. Microbiol.*, 27:70-76.
- PERRIN P.W. and TOWERS G.H.N., 1973 - Metabolism of aromatic acids by *Polyporus hispidus*. *Phytochem.*, 12:583-587.
- RAO C.P. and SUNDARAMURTHY V., 1986 - Hydroxychalcone analogs of 5-nitrofurfural and their antibacterial activity. *Indian J. Chem. Sect. B Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, 25:447-448.

- RAPER K.B. and FENNEL D.I., 1965 - **The Genus *Aspergillus***.
The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- REDDY C.C. and VAIDYANATHAN C.S., 1975 - Purification,
properties and induction of a specific benzoate-4-
hydroxylase from *Aspergillus niger* (UBC 814).
Biochim. Biophys. Acta, 384:46-57.
- RIBBONS D.W., 1970 - Stoichiometry of O-demethylase activity
in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.*, 8:101-104.
- ROBBINS W.J. and KAVANAGH F., 1938 - Vitamine B1 or its
intermediates and the growth of certain fungi. *Amer.*
J. Bot., 25:229-236.
- ROGERS C.H., 1938 - Growth of *Phymatotrichum omnivorum* in
solution with varying amounts of certain mineral
elements. *Amer. J. Bot.*, 25:621-624.
- ROLAND Jr J.F. and WEINER B.A., 1955 - Bio-oxygenation of
progesterone by mushrooms. *Science*, 121:803-804.
- ROUKAS T. and HARVEY L., 1988 - The effect of pH on
production of citric and gluconic acid from beet
molasses using continuous culture. *Biotechnol. Lett.*,
10:289-294.
- ROUKAS T., 1991 - Influence of impeller speed on citric acid
production and selected enzyme activities of TCA
cycle. *J. Ind. Microbiol.*, 7:221-226.
- ROYER G., LIVERNOCHE D., DESROCHERS M., JURASEK L., ROULEAU
D. and MAYER R.C., 1983 - Decolorization of kraft mill
effluent : kinetics of continuous process using
immobilized *Coriolus versicolor*. *Biotechnol. Lett.*,
5:321-326.
- SAHASRABUDHE S.R., LALA D. and MODI V.V., 1986 - Degradation
of orcinol by *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.*,
32:535-538.
- SANCHOLLE M., 1984 - Etude des lipides de quelques
champignons. Effets du propiconazole, inhibiteur de
synthèse des stérols. Thèse de Doctorat d'Etat, Biol.
Vég. Mycol., Toulouse n°1165.
- SCHUYTEMA E.C., HARGIE M.P., SIEHR D.J., MERITS I., SCHENCK
J.R., SMITH M.S. and VARNER E.L., 1963 -
Transformations of progesterone by Basidiomycetes.
Appl. Microbiol., 11:256-259.
- SCOTT C.D., 1987 - Immobilized cells : a review of recent
literature. *Enzyme Microb. Technol.*, 9:66-73.

- SHAW J.-F. and LIAW E.-T., 1987 - Preparation of acyl derivatives of 1-hydroxy aldose by lipase-catalyzed hydrolysis or alcoholysis of fully acylated aldose in organic solvent. Proceedings of "Biocatalysis in Organic Media" Symposium, Wageningen, The Netherlands, 7-10 December 1986.
- SILBIGER E. and FREEMAN A., 1987 - Continuous cell immobilization in crosslinked polyacrylamide-hydrazide beads. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**:675-680.
- SMITH J.E. and BERRY D.R., 1975 - **The Filamentous Fungi. Vol. I. Industrial Mycology.** Edward Arnold, London.
- SMITH J.E. and PATEMAN J.A., 1977 - **Genetics and Physiology of *Aspergillus*.** Academic Press, London - New-York - San Francisco.
- SMITH R.V. and ROSAZZA J.P., 1974 - Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**:551-558.
- SODE K., KARUBE I., ARAKI R. and MIKAMI Y., 1989 - Microbial conversion of β -ionone by immobilized *Aspergillus niger* in the presence of an organic solvent. *Biotechnol. Bioeng.*, **33**:1191-1195.
- STEINBERG R.A., 1936 - Relation of accessory growth substances to heavy metals, including molybdenum, in the nutrition of *Aspergillus niger*. *J. Agric. Res.*, **52**:439-448.
- SUGUMARAN M. and VAIDYANATHAN C.S., 1979 - Microsomal hydroxylation of phenylacetic acid by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **5**:427-430.
- SZCZODRAK J. and ILCZUK Z., 1985 - Effect of iron on the activity of aconitate hydratase and synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Zentralbl. Mikrobiol.*, **140**:567-574.
- TAKAHASHI J., HIDAKA H and YAMADA K., 1965 - Effect of mycelial forms on citric acid fermentation in submerged mold culture. *Agr. Biol. Chem.*, **29**:331-336.
- TIEN M. and KIRK T.K., 1983 - Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science*, **221**:661-663.
- TIEN M., 1987 - Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, **15**:141-168.
- TOLDRA F., JANSEN N.B. and TSAO G.T., 1986 - Use of porous glass fiber as a support for biocatalyst immobilization. *Biotechnol. Lett.*, **8**:785-790.

- TOMS A. and WOOD J.M., 1970 - The degradation of trans-ferulic acid by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochem.*, 9:337-343.
- TOROPOVA E.G., MAKSIMOV V.N., MARDAMSHINA A.D. and PISKUNKOVA N.F., 1989 - The effect of cations of some metals on antiobiotic and pigment formation by the mycophilic fungus *Hypomyces rosellus* 94/77. *Biol. Nauki. (Mosc.)*, 2:84-88.
- TROJANOWSKI J. and HÜTTERMANN A., 1987 - Screening of wood inhabiting fungi for their capacity to degrade and to solubilize ¹⁴C-labelled lignin. *Microbios*, 50:91-97.
- TSAY S.S. and TO K.Y., 1987 - Citric acid production using immobilized conidia of *Aspergillus niger* TMB 2022. *Biotechnol. Bioeng.*, 29:297-304.
- VAIJA J. and LINKO P., 1986 - Continuous citric acid production by immobilized *Aspergillus niger* : reactor performance and fermentation kinetics. *J. Mol. Catal.*, 38:237-254.
- VAN BALKEN J.A.M., SCHMITZ G.J., MEIJER E.M., CORDEWENER J.H.G. and VISSER J., 1987 - Development of biocatalysts with mono-oxygenase activity : optimization of the production of benzoate-para-hydroxylase by *Aspergillus niger*. "Enzyme engineering", Los Angeles, October, 1987.
- VANCE C.P., NAMBU DIRI M.D. and TOWERS G.H.N., 1973 - Cinnamate-4-hydroxylase in *Polyporus hispidus*. *Can. J. Bioch.*, 51:731-734.
- VERSAW W.K., BEVINS M.A. and MARKWELL J., 1991 - Purification of a 4-nitrophenylphosphatase from *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 287:85-90.
- VEZINA C. and SINGH K., 1975 - Transformation of organic compounds by fungal spores. In "The Filamentous Fungi. Vol. I. Industrial Mycology", pp 158-192. Smith J.E. and Berry D.R. eds., Edward Arnold, London.
- WALKER J.R.L. and MC CALLION R.F., 1980 - The selective inhibition of ortho- and para-diphenol oxydases. *Phytochem.*, 19:373-377.
- WEINHOLD A.R. and HENDRIX Jr F.F., 1963 - Inhibition of fungi by culture media previously exposed to light. *Phytopathology*, 53:1280-1284.
- YANAGITA T. and KONAGÉ F., 1963 - Cytochemical and physiological differentiation of mould pellets. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 9:179-187.
- YOUNG H.C. and BENNETT C.W., 1922 - Growth of some parasitic fungi in synthetic culture media. *Amer. J. Bot.*, 9:459-469.

YUASA K., ISHIZUKA K., KABURAKI S. and SAKASAI T., 1975 -
Metabolism of phenylalanine in *Aspergillus sojae*. *Agr.*
Biol. Chem., 39:2199-2206.

ZAFAR S.I. and COLOTELO N., 1978 - Influence of various
inorganic oxidants and organic compounds on mycelial
growth and pycnidial production of *Plenodomus*
melilotii in light and darkness. *Can. J. Bot.*,
56:1588-1593.

