



**HAL**  
open science

## Etude de la production de 1,3-propanediol par différentes souches de clostridium butyricum

Hassiba Malaoui

► **To cite this version:**

Hassiba Malaoui. Etude de la production de 1,3-propanediol par différentes souches de clostridium butyricum. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2001. Français. NNT : 2001NAN10014 . tel-01747564

**HAL Id: tel-01747564**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747564>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



FACULTE DES SCIENCES

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques  
Ecole Doctorale Biologie-Santé-Environnement

## THESE

Présentée pour l'obtention du titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I**

en

Biologie Structurale, Moléculaire et Cellulaire

par

**Hassiba MALAOU**

**ETUDE DE LA PRODUCTION DE 1,3-PROPANEDIOL  
PAR DIFFERENTES SOUCHES DE  
*CLOSTRIDIUM BUTYRICUM***

Soutenue publiquement le 24 avril 2001

### Membres du jury :

<b>Président :</b>	M. Roger BONALY	Professeur, U.H.P.-Nancy I
<b>Rapporteurs :</b>	Mme Odile BOUVET	Chargée de Recherche INSERM, Institut Pasteur, Paris
	M. Jean François CAVIN	Professeur ENSBANA, Dijon
<b>Examineurs :</b>	M. Henri PETITDEMANGE	Professeur, U.H.P.-Nancy I
	M. Regis MARCZAK	Maître de Conférences, U.H.P.-Nancy I Directeur de recherche

## DEDICACES

*Je dédie cette thèse :*

*A mes parents*

*A la mémoire de mes grands parents*

*Pour Samir*

*A mes frères et sœurs*

*A mes beaux parents*

*A mes amies*

## REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier tous ceux qui ont, de près ou de loin, aidé à la réalisation de ce travail:*

*Monsieur le Professeur Henri Petitdemange pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram+ et avoir accepté de juger ce travail.*

*Monsieur Regis Marczał pour avoir dirigé cette thèse et prodigué de judicieux conseils. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a témoignée.*

*J'exprime ma plus profonde gratitude aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail : Madame Odile Bouvet, Chargée de Recherche INSERM, Institut Pasteur de Paris, Monsieur Jean François Cavin, Professeur à l'ENSBANA de Dijon et Monsieur Roger Bonaly, Professeur à l'Université Henri Poincaré-Nancy 1.*

*Je remercie également toutes les personnes qui m'ont soutenues par leurs conseils, leur amitié et leur bonne humeur.*

# SOMMAIRE

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>1</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>7</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>9</b>
<b>Chapitre I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>11</b>
<b>I.1. LE GLYCEROL</b> .....	<b>11</b>
<b>I.1.1. Origine et gisement</b> .....	<b>11</b>
I.1.1.1. La synthèse pétrochimique .....	11
I.1.1.2. La filière oléochimique .....	12
I.1.1.3. L'industrie des bio-carburants .....	12
<b>I.1.2. Domaines d'utilisation</b> .....	<b>13</b>
I.1.2.1. Utilisation directe .....	13
I.1.2.2. Multifonctionnalité alcoolique .....	14
I.1.2.3. Produits et transformation biologique .....	14
<b>I.1.3. Métabolisme du glycérol</b> .....	<b>14</b>
I.1.3.1. Généralités .....	14
I.1.3.2. Le transport .....	15
<i>I.1.3.2.1. Le transport du glycérol</i> .....	<i>15</i>
<i>I.1.3.2.2. Le transport du glycérol-3-phosphate</i> .....	<i>16</i>
I.1.3.3. Les voies d'assimilation du glycérol .....	16
<i>I.1.3.3.1. La voie du glycérol-3-phosphate</i> .....	<i>16</i>
<i>I.1.3.3.2. La voie de la dihydroxyacétone</i> .....	<i>18</i>
I.1.3.4. Les voies cataboliques du glycérol .....	20
<i>I.1.3.4.1. Chez les bactéries aérobies</i> .....	<i>21</i>
<i>I.1.3.4.2. Chez les bactéries anaérobies facultatives</i> .....	<i>23</i>
<i>I.1.3.4.3. Chez les bactéries anaérobies strictes</i> .....	<i>38</i>
<i>I.1.3.4.4. Chez les levures et les champignons</i> .....	<i>40</i>

<b>I.2. LE 1,3-PROPANEDIOL .....</b>	<b>41</b>
<b>I.2.1. Propriétés et gisement .....</b>	<b>41</b>
<b>I.2.2. Domaines d'utilisation .....</b>	<b>41</b>
<b>I.2.3. Les procédés de production du 1,3-propanediol .....</b>	<b>44</b>
I.2.3.1. Les conditions de culture .....	44
<i>I.2.3.1.1. Les besoins nutritifs .....</i>	<i>44</i>
<i>I.2.3.1.2. Les conditions opératoires .....</i>	<i>44</i>
I.2.3.2. Les procédés et performances fermentaires .....	45
<i>I.2.3.2.1. Culture discontinue .....</i>	<i>45</i>
<i>I.2.3.2.1. Culture en fed-batch .....</i>	<i>46</i>
<i>I.2.3.2.2. Culture continue .....</i>	<i>46</i>
<i>I.2.3.2.4. Autres stratégies de fermentation .....</i>	<i>47</i>
<i>I.2.3.2.5. Autres études .....</i>	<i>49</i>
<b>I.3. LE REGULON <i>dha</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>I.3.1. Généralités .....</b>	<b>50</b>
<b>I.3.2. La voie oxydative .....</b>	<b>51</b>
I.3.2.1. La glycérol déshydrogénase .....	51
I.3.2.2. La dihydroxyacétone kinase .....	54
<b>I.3.3. La voie réductrice .....</b>	<b>55</b>
I.3.3.1. La glycérol déshydratase .....	55
I.3.3.2. La 1,3-propanediol déshydrogénase .....	59
<b>I.4. REGULATION DU METABOLISME DES GLUCIDES ET DU GLYCEROL ..61</b>	
<b>I.4.1. Régulation enzymatique .....</b>	<b>61</b>
I.4.1.1. Le régulon <i>dha</i> .....	61
I.4.1.2. La voie glycolytique .....	62
I.4.1.3. La décarboxylation oxydative du pyruvate .....	63
I.4.1.4. Les voies acidogènes .....	66
I.4.1.5. Les voies de synthèse des alcools .....	70
<b>I.4.2. Inhibition par les métabolites .....</b>	<b>71</b>
I.4.2.1. Influence des substrats .....	71
<i>I.4.2.1.1. La répression catabolique .....</i>	<i>71</i>
<i>I.4.2.1.2. Inhibition par le glycérol .....</i>	<i>72</i>



I.4.2.2. Influence des produits .....	73
I.4.2.2.1. Les alcools .....	73
I.4.2.2.2. Les acides .....	75
I.4.2.3. Influence des intermédiaires métaboliques .....	76
I.4.2.3.1. Le méthylglyoxal .....	76
I.4.2.3.2. Le 3-hydroxypropionaldéhyde .....	77
I.4.2.3.3. Autres intermédiaires métaboliques .....	78
<b>I.4.3. Cas particulier de <i>Clostridium butyricum</i> .....</b>	<b>79</b>
I.4.3.1. Micro-organisme .....	79
I.4.3.2. Conditions de culture .....	79
I.4.3.3. Performances fermentaires .....	80
I.4.3.4. Les voies métaboliques .....	82
I.4.3.4.1. Fermentation du glucose .....	82
I.4.3.4.2. Fermentation du glycérol .....	82
I.4.3.4.3. La réaction phosphoroclastique .....	86
I.4.3.5. La fermentation du glycérol par différentes souches .....	88
I.4.3.5.1. En batch et en fed-batch .....	88
I.4.3.5.2. En culture continue .....	92
 <b>Chapitre II. MATERIELS ET METHODES .....</b>	 <b>94</b>
<b>II.1. SOUCHES UTILISEES .....</b>	<b>94</b>
<b>II.2. MILIEUX DE CULTURE .....</b>	<b>94</b>
II.2.1. Milieu de Homann .....	94
II.2.2. Milieu RCM (Reinforced Clostridial Medium) .....	95
II.2.3. Milieu utilisé en cultures discontinues à pH régulé .....	96
II.2.4. Milieu utilisé en cultures continues .....	96
<b>II.3. CONDITIONS DE CULTURE .....</b>	<b>96</b>
II.3.1. Cultures en tubes .....	96
II.3.2. Cultures en fermenteur .....	96
II.3.2.1. Cultures discontinues .....	96
II.3.2.2. Cultures continues .....	97

<b>II.4. METHODES ANALYTIQUES .....</b>	<b>97</b>
<b>II.4.1. Détermination de la concentration cellulaire .....</b>	<b>97</b>
<b>II.4.2. Dosage des substrats et des produits .....</b>	<b>98</b>
II.4.2.1. Dosages par CLHP .....	98
II.4.2.2. Dosages par CPG .....	98
<b>II.4.3. Dosage par méthodes enzymatiques .....</b>	<b>99</b>
II.4.3.1. Le glucose .....	99
II.4.3.2. Le glycérol .....	99
II.4.3.3. Le glycéraldéhyde .....	100
II.4.3.4. L'acétate .....	100
<b>II.5. DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES .....</b>	<b>101</b>
<b>II.5.1. Préparation des extraits acellulaires .....</b>	<b>101</b>
<b>II.5.2. Détermination des activités enzymatiques spécifiques .....</b>	<b>101</b>
II.5.2.1. Dosage de la concentration en protéines .....	101
II.5.2.2. Glycérol ou 1,3-propanediol déshydrogénase .....	101
II.5.2.3. Glycérol déshydratase .....	102
II.5.2.4. Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase .....	103
II.5.2.5. Hydrogénase .....	103
II.5.2.6. Acétate et butyrate kinase .....	104
<b>II.6. DETERMINATION DES CONCENTRATIONS EN NUCLEOTIDES .....</b>	<b>104</b>
<b>II.6.1. Dosage du NAD<sup>+</sup> intracellulaire .....</b>	<b>105</b>
II.6.1.1. Extraction .....	105
II.6.1.2. Dosage du NAD <sup>+</sup> .....	105
<b>II.6.2. Dosage du NADH intracellulaire .....</b>	<b>106</b>
II.6.2.1. Extraction .....	106
II.6.2.2. Dosage du NADH .....	106
<b>II.6.3. Dosage de l'acétyl-CoA .....</b>	<b>107</b>
II.6.3.1. Extraction .....	107
II.6.3.2. Dosage de l'acétyl-CoA par spectrophotométrie .....	107

<b>II.7. PURIFICATION DES 1,3-PROPANEDIOL ET GLYCEROL</b>	
<b>DESHYDROGENASES .....</b>	<b>108</b>
<b>II.7.1. Préparation de l'extrait brut .....</b>	<b>108</b>
<b>II.7.2. Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions .....</b>	<b>108</b>
II.7.2.1. Principe .....	108
II.7.2.2. Protocole .....	108
<b>II.7.3. Ultrafiltration .....</b>	<b>109</b>
II.7.3.1. Principe .....	109
II.7.3.2. Protocole .....	109
<b>II.7.4. Chromatographie sur colonne de filtration sur gel .....</b>	<b>109</b>
II.7.4.1. Principe .....	109
II.7.4.2. Protocole .....	110
<b>II.7.5. Détermination de la masse molaire de l'enzyme native .....</b>	<b>110</b>
<b>II.7.6. Séparation électrophorétique en conditions dénaturantes</b>	
<b>(SDS PAGE) .....</b>	<b>110</b>
II.7.6.1. Principe .....	110
II.7.6.2. Protocole .....	111
<b>II.7.7. Détermination de la séquence NH<sub>2</sub>-terminal de la 1,3-propanediol</b>	
<b>Déshydrogénase .....</b>	<b>114</b>
<b>II.7.8. Caractérisation des 1,3-propanediol et glycérol déshydrogénases ...</b>	<b>114</b>
II.7.8.1. Détermination du pH optimum .....	114
II.7.8.2. Détermination des paramètres cinétiques .....	114
II.7.8.3. Détermination de la spécificité de substrat .....	114
II.7.8.4. Détermination de l'effet des cations divalents .....	115
 <b>Chapitre III. RESULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	 <b>116</b>
 <b>Partie 1. INFLUENCE DE L'AJOUT D'UN CO-SUBSTRAT DE LA 1,3-PROPANEDIOL</b>	
<b>DESHYDROGENASE SUR L'UTILISATION DU GLYCEROL PAR <i>CLOSTRIDIUM</i></b>	
<b><i>BUTYRICUM</i> .....</b>	<b>116.</b>
1. INTRODUCTION .....	116
2. RESULTATS ET DISCUSSION .....	118
3. CONCLUSION .....	139

<b>Partie 2. ETUDE DE L'EFFET DE COFERMENTATION GLUCOSE-GLYCEROL SUR LE FLUX CARBONE CHEZ <i>CLOSTRIDIUM BUTYRICUM</i> E5 ET E5 MD CULTIVES EN CHEMOSTAT .....</b>	<b>142</b>
1. INTRODUCTION .....	142
2. RESULTATS .....	144
3. CONCLUSION .....	153
<b>Partie 3. PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA 1,3-PROPANEDIOL DESHYDROGENASE ET DE LA GLYCEROL DESHYDROGENASE CHEZ <i>CLOSTRIDIUM BUTYRICUM</i> .....</b>	<b>155</b>
1. INTRODUCTION .....	155
2. RESULTATS .....	156
2.1. La 1,3- propanediol déshydrogénase .....	156
2.2. La glycérol déshydrogénase .....	164
3. CONCLUSION .....	169
<b>Partie 4. SEPARATION ET CARACTERISATION DES ACTIVITES 1,3-PROPANEDIOL DESHYDROGENASE ET GLYCEROL DESHYDROGENASE CHEZ <i>CLOSTRIDIUM BUTYRICUM</i> E5 SAUVAGE ET MUTANT D .....</b>	<b>171</b>
1. INTRODUCTION .....	171
2. RESULTATS .....	171
3. CONCLUSION .....	181
<b>Chapitre IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>182</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>186</b>

# **ABBREVIATIONS**

# ABBREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
ARN	Acide ribonucléique
AS	Activité spécifique
ADP/ATP	Adénosine di ou triphosphate
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Serum albumine bovine
CLHP	Chromatographie liquide à haute pression
CoA	Coenzyme A
CoB12	Coenzyme B12
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CPD	Complexe pyruvate déshydrogénase
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CTP	Cytidine triphosphate
D	Taux de dilution
Da	Dalton
DHA	Dihydroxyacétone
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DL-Gld	DL-glycéraldéhyde
DO	Densité optique
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	Dithiothréitol
EC	Classification enzymatique ("Enzyme classification")
EMP	Voie d'Embden-Meyerhof-Parnas
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
FAD	Flavine adénine dinucléotide
fd	Férredoxine
F1,6diP	Fructose 1,6-diphosphate
FHL	Formiate hydrogène-lyase
FMN	Flavine mononucléotide
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatographie
GAP	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
G3P	Glycérol-3-phosphate
Glu/Gly	Rapport (glucose/glycérol)
GTP	Guanosine triphosphate
3-HPA	3-Hydroxypropionaldéhyde
HPr	Protéine thermostable (High protein)
IP	Institut Pasteur
ITP	Inosine triphosphate
KDa	Kilodalton
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
KPB	Tampon phosphate de potassium
MBTH	3-Méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone
MD	Mutant D
MM	Masse moléculaire

NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PBT	Polybutylène téréphtalate
PEP	Phosphoénolpyruvate
PET	Polyéthylène téréphtalate
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PFL	Pyruvate formiate-lyase
Pi	Phosphate inorganique
1,2-PPD	1,2-propanediol
1,3-PPD	1,3-propanediol
PPT	Polypropylène téréphtalate
PTS	Système phosphotransférase
PU	Polyuréthane
q acétate	Vitesse spécifique de formation de l'acétate
q butyrate	Vitesse spécifique de formation de butyrate
q glucose	Vitesse spécifique d'utilisation du glucose
q glycérol	Vitesse spécifique d'utilisation du glycérol
q NADH	Vitesse spécifique de formation du NADH
q 1,3-PPD	Vitesse spécifique de formation de 1,3-propanediol
RCM	Reinforced Clostridial Medium
rpm	Rotation par minute
S-D	Déviaton standard
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TPP	Thiamine pyrophosphate
TEMED	N-N'-N'-N'-tétraméthyléthyldiamine
U	Unité enzymatique
UTP	Uridine triphosphate
VPI	Virginia Polytechnic Institute
WT	Wild type
Y <sub>1,3-PPD</sub>	Rendement en 1,3-propanediol
Y <sub>ATP</sub>	Rendement en ATP

# AVANT - PROPOS



# AVANT-PROPOS

Le glycérol dont la production annuelle mondiale atteint actuellement 450 000 tonnes, était, encore récemment, essentiellement obtenu par voie pétrochimique à partir du propylène comme composé secondaire de l'industrie oléochimique.

Depuis quelques années, son marché est en passe de connaître un nouvel essor du fait du développement de filières de valorisation des matières premières agricoles par la production de bio-carburants. Parmi ceux ci figurent l'éthanol, formé à partir de glucides simples et de polymères osidiques des végétaux ainsi que d'esters, issus de l'estérification des triglycérides des matières grasses. Un exemple est le diester produit à partir de l'huile de colza. En effet, le glycérol est le co-produit majeur de la fabrication de ces produits énergétiques d'origine végétale.

Face à l'augmentation de la production du glycérol, il apparaît nécessaire d'élargir les domaines d'utilisation de ce composé, et notamment de lui rechercher de nouvelles voies de transformation en molécules d'intérêt industriel.

Face à cet objectif, la conversion par voie microbienne ouvre de larges potentialités. En effet, le glycérol intervient dans la plupart des voies cataboliques générales des substrats carbonés (glycolyse, cycle des pentoses...) et est assimilable par de nombreux micro-organismes ce qui ouvre une gamme étendue de produits de conversion :

## ✓ La dihydroxyacétone (DHA)

Elle est formée au cours du métabolisme oxydatif du glycérol par les bactéries acétiques et *Cellulomonas sp.* C'est un produit à haute valeur ajoutée. Cette molécule est déjà actuellement produite par voie biologique et essentiellement utilisée en cosmétologie. Le marché actuel présente l'inconvénient d'être limité mais des perspectives de développement peuvent être offertes grâce à son utilisation en synthèse chimique.

## ✓ Le 1,3-propanediol

Il est formé au cours de la dégradation anaérobie du glycérol par certaines espèces d'entérobactéries et de Clostridia. Le 1,3-propanediol est actuellement produit par voie chimique. Ce procédé présente le double inconvénient d'un coût de fabrication élevé et de risques importants liés à la toxicité des composés utilisés.

La production par voie biologique du 1,3-propanediol a été démontrée chez quelques micro-organismes. Cette filière peut concurrencer la filière chimique, du fait de la diminution marquée du prix de production et de l'innocuité de la méthode.

Le 1,3-propanediol présente l'avantage d'un marché largement ouvert, dans les domaines de fabrication de polyesters et de polyuréthanes (par substitution au 1,4-butanediol, 1,2-propanediol et à l'éthylène glycol).

La conversion microbienne du glycérol en 1,3-propanediol met en jeu une voie métabolique simple, en deux étapes. L'analyse détaillée des données bibliographiques nous a permis de montrer que cette transformation correspond en fait à une réalité biologique beaucoup plus complexe, liée à la multiplicité des enzymes impliquées dans le catabolisme du substrat, à la diversité des systèmes de régulation et au rôle joué par le système accepteur final d'électrons. Le glycérol est un composé présentant un degré de réduction élevé, dont la conversion en pyruvate (par la voie de la glycolyse chez les micro-organismes anaérobies) conduit à la formation d'un excès d'équivalents réducteurs par rapport aux substrats osidiques.

D'un point de vue physiologique, l'utilisation du glycérol en tant que source de carbone augmente le flux de coenzymes réduits formés au cours de la croissance microbienne. Elle constitue un modèle d'étude face au problème d'équilibre d'oxydoréduction cellulaire, et notamment la régulation du métabolisme par le pool intracellulaire d'équivalents réducteurs. L'intérêt d'acquérir une bonne compréhension de ces mécanismes se manifeste également au plan du génie microbiologique puisqu'ils conditionnent les performances fermentaires des micro-organismes.

Lors de l'utilisation du glycérol, la particularité du métabolisme microbien réside dans la nécessité de la présence d'un système exogène accepteur d'électrons. Ce rôle est joué par l'oxygène en conditions aérobies et par un accepteur d'électrons (moins réduit que le glycérol) ou une voie métabolique consommatrice d'équivalents réducteurs en conditions anaérobies.

**ANALYSE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

# Chapitre I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

## I.1. LE GLYCEROL

Le glycérol (propane-1,2,3-triol), composé organique de formule condensée  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ , est un liquide sirupeux, incolore et inodore, à saveur sucrée. Il est miscible à l'eau, à l'acétone et aux alcools, mais il est insoluble dans le benzène, l'éther, le chloroforme et le tétrachlorure de carbone.

Ce composé, de masse moléculaire 92,09 et de densité 1,26, présente une température d'ébullition de 290,2 °C (Nicaud, 1980).

Le glycérol est un constituant essentiel des matières grasses végétales et animales, mélange de triglycérides résultant de la combinaison du glycérol avec certains acides gras : stéarique, oléique, palmitique, linoléique... (Karlson, 1971 ; Goncedo et Serrano, 1989).

Ce composé est également rencontré dans les sous-produits de distillation de bioéthanol, en tant que co-métabolite de la fermentation alcoolique des glucides par les levures, qui utilisent une partie du substrat osidique pour la formation du glycérol, éliminant ainsi les coenzymes réduits formés au cours du catabolisme cellulaire ( Goncedo et Serrano, 1989).

### I.1.1. Origine et gisement

De sa découverte, en 1779 par le suédois Scheele, à la deuxième guerre mondiale, le glycérol a été exclusivement fabriqué en tant que co-produit de la manufacture des bougies et des savons ou des fermentations alcooliques.

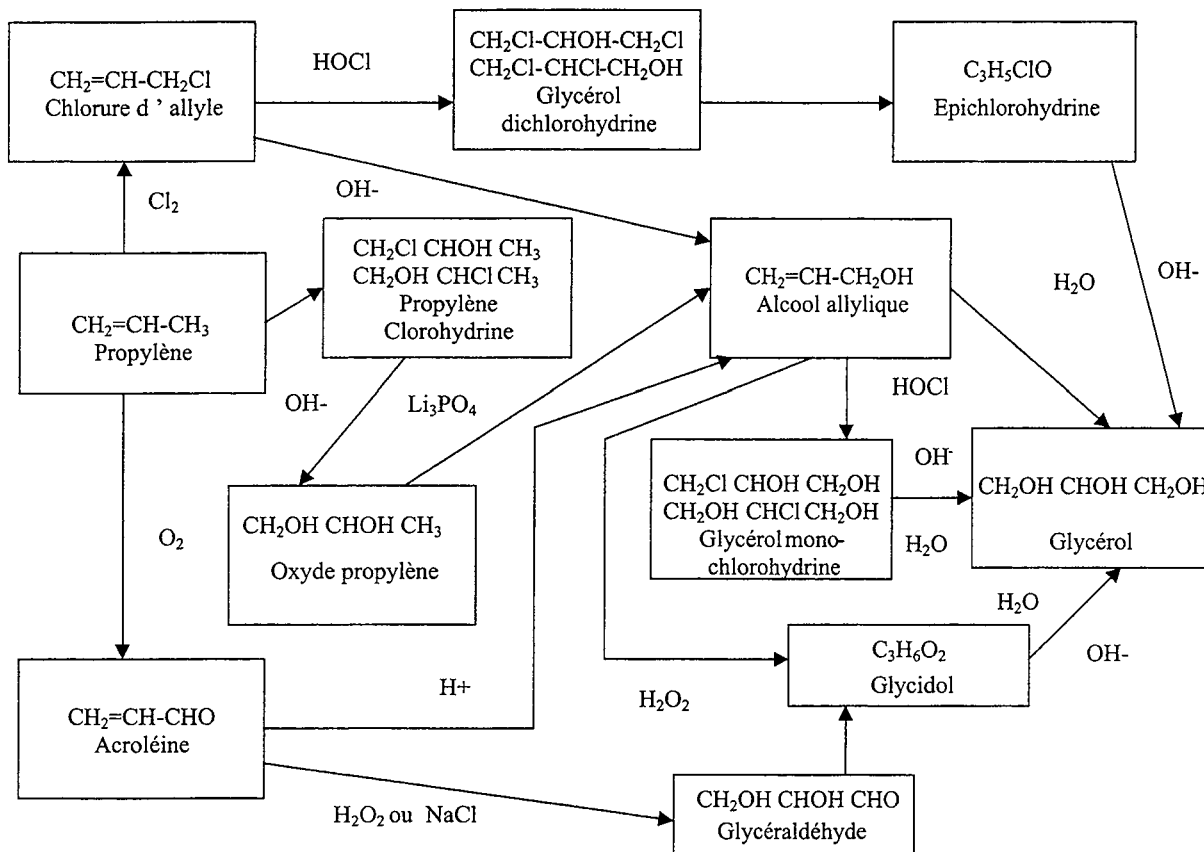
Actuellement, la production de glycérol a trois origines principales :

#### I.1.1.1. La synthèse pétrochimique

Elle couvre environ 25% de la production mondiale. Le procédé le plus utilisé fait appel à une chloration du propylène, suivie de la formation du composé époxy correspondant et d'une hydrolyse (**Figure 1**) selon le schéma suivant:

Propylène  $\longrightarrow$  chlorure d'allyle  $\longrightarrow$  épichlorydrine  $\longrightarrow$  glycérol

D'autres technologies, moins dangereuses car n'ayant pas recours au chlore, sont également développées comme par exemple l'obtention d'oxyde de propylène et de glycidol par action de l'acide peracétique sur le propylène.



**Figure 1.** Production du glycérol par voie chimique (Agarwal, 1993).

### I.1.1.2. La filière oléochimique

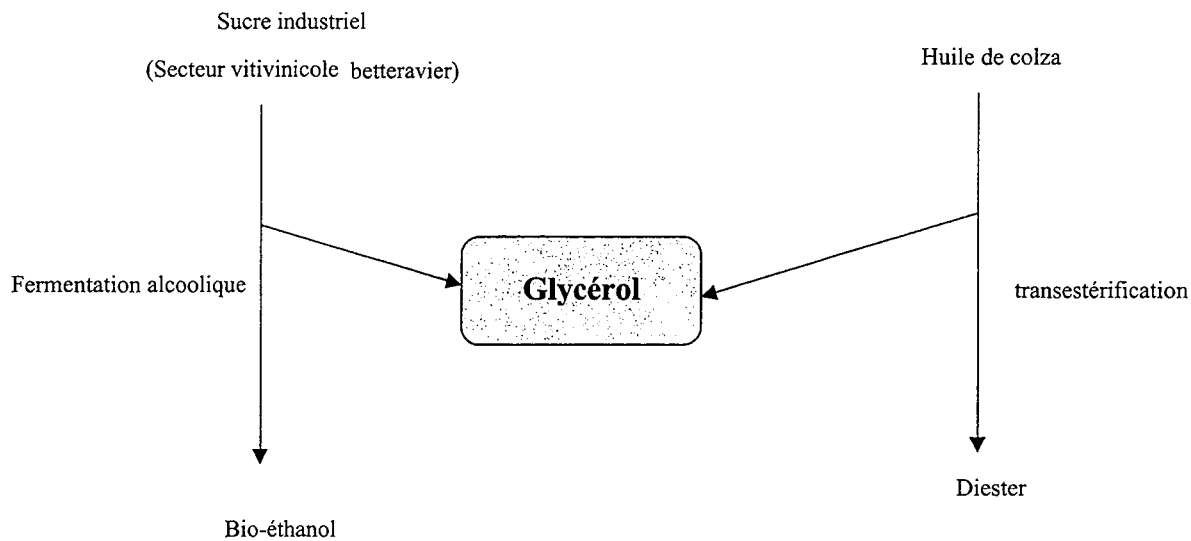
Les 2/3 de la production mondiale sont obtenus par la saponification des huiles et des graisses par des bases fortes (soude, potasse) au cours de la fabrication des savons et de la préparation des acides gras. Il faut toutefois noter que ce secteur de production de glycérol tend à régresser, du fait de l'apparition de détergents synthétiques en substitution aux savons.

### I.1.1.3. L'industrie des bio-carburants

Récemment, des perspectives de production de glycérol ont été ouvertes par le développement de la production de nouveaux carburants d'origine végétale (**Figure 2**) :

- ✓ le bio-éthanol : le glycérol est présent dans les résidus de distillation d'alcool des secteurs vitivinicoles et betteraviers; il est le métabolite secondaire de la fermentation alcoolique par les levures.

- ✓ le diester : la fabrication de diester (« diesel vert ») à partir d'huile de colza engendre la production d'effluents contenant un taux non négligeable de glycérol.



**Figure 2.** Production de glycérol associée aux nouvelles productions industrielles de biocarburants.

### **I.1.2. Domaines d'utilisation**

Du fait de ses propriétés physico-chimiques et de sa multi-fonctionnalité alcoolique, les domaines d'utilisation du glycérol sont nombreux.

#### **I.1.2.1. Utilisation directe**

L'utilisation directe du glycérol met à profit ses propriétés physico-chimiques.

- ✓ Formulation des cosmétiques hydratants.
- ✓ Elaboration d'encre, de peintures, de mastics, de colles...
- ✓ Additif alimentaire (conservateur et/ou édulcorant).
- ✓ Antigel.

### **I.1.2.2. Multifonctionnalité alcoolique**

La multifonctionnalité alcoolique permet des applications après transformations chimiques du glycérol.

- ✓ Synthèse de nitroglycérine (estérification des fonctions alcools par l'acide nitrique).
- ✓ Formation de résines glycérophthaliques ou alkydes entrant dans la formulation des peintures.
- ✓ Production de triacétine (triacétate de glycérol) par estérification par l'acide acétique, utilisée comme plastifiant et en parfumerie.

### **I.1.2.3. Produits de transformation biologique**

Polyol à 3 atomes de carbone, le glycérol intervient, après transformation en dihydroxyacétonephosphate (DHAP) dans les voies cataboliques classiques des substrats carbonés : glycolyse, cycle des pentoses, voies fermentaires anaérobies (synthèse d'acides et de solvants). Il est donc assimilable par de nombreux micro-organismes et la présence chez certains d'entre-eux de voies métaboliques particulières conduit à la formation de composés présentant un intérêt industriel notable : la dihydroxyacétone (DHA) (métabolisme oxydatif des bactéries acétiques) et le 1,3-propanediol (1,3-PPD) (réduction de la glycérol par certaines espèces d'Entérobactéries et de Clostridia).

## **I.1.3. Métabolisme du glycérol**

### **I.1.3.1. Généralités**

Le glycérol est un composé chimiquement plus réduit que le glucose, son oxydation fournit deux fois plus d'espèces réductrices par mole de carbone consommé que la dégradation du glucose.

D'après Lin (1976), il existe seulement deux modes d'assimilation du glycérol :

- ✓ une déshydrogénation suivie d'une phosphorylation
- ✓ une phosphorylation suivie d'une déshydrogénation

Dans les deux cas, le produit final est la DHAP. Mais ce processus, au schéma métabolique simple est, en fait, relativement complexe.

Tout d'abord, certains micro-organismes sont capables d'utiliser, non seulement le glycérol, mais aussi le glycérol-3-phosphate (G3P) ou la DHA qui sont des intermédiaires du

métabolisme. Le transport de ces substrats à l'intérieur de la cellule peut être réalisé par l'intermédiaire d'une protéine de perméation unique.

### I.1.3.2. Le transport

#### I.1.3.2.1. Le transport du glycérol

Les premières données relatives aux processus de transport du glycérol à travers la membrane remontent aux travaux de Fischer qui, en 1903, ont montré que des solutions hypertoniques de glycérol ne provoquent pas une plasmolyse des bactéries. L'existence d'une diffusion passive à travers la membrane cellulaire fut alors suggérée. Plus tard, cette hypothèse fut confirmée par des études avec *E. coli*, basées sur l'observation du volume cellulaire (Mitchell et Moyle, 1959) et le suivi d'équilibres de solutés de part et d'autre de la membrane (Bovell et coll., 1963) dans des conditions de stress osmotique dues au glycérol. A la différence de l'ensemble de ces travaux réalisés en présence de fortes concentrations en glycérol, Hayashi et Lin (1965a) se sont placés dans des conditions de limitation. Ainsi l'absence d'un système de transport actif du glycérol a été démontrée. Le passage du glycérol à travers la membrane résulterait d'un déplacement permanent de l'équilibre osmotique par conversion du glycérol en glycérol-3-phosphate(G3P) par la glycérol kinase présente chez *E. coli* en conditions aérobies. Plus tard, Sanno et coll. (1968) et Rickey et Lin (1972) ont démontré qu'un processus de diffusion facilitée existait chez *E. coli* impliquant simultanément une protéine codée par le gène *glpF* et la glycérol kinase codée par le gène *glpK*. Associés, car appartenant au même opéron nommé *glpFK* (Lin, 1976), ces deux gènes ont fait l'objet de plusieurs travaux. Ainsi la protéine de transport de *E. coli* a été isolée et caractérisée : contenant 281 acides aminés, soit une masse moléculaire de 29780 Da, cette protéine, à la fois membranaire et cytoplasmique, présente un caractère très hydrophobe et est composée au minimum de 6 hélices alpha transmembranaires (Weissenborn et coll., 1992).

L'ensemble de ces données porte sur le transport du glycérol par des cellules d'*E. coli* cultivées en conditions aérobies. Aucune donnée précise n'est disponible sur les processus de passage transmembranaire du glycérol pour des cellules maintenues en anaérobiose, bien que la présence d'un même mécanisme de diffusion facilitée soit suspectée (Lin, 1976). Cette hypothèse est de plus confortée par l'absence de différences significatives, en terme de temps d'équilibre transmembranaire, entre le transport du glycérol en conditions aérobies et anaérobies chez des espèces du genre *Klebsiella* (Bouvet et coll., 1994).



### ***I.1.3.2.2. Le transport du glycérol-3-phosphate***

Le passage du G3P à travers la membrane serait dépendant d'un système de transport spécifique impliquant une perméase (Hayashi et coll., 1964) dont le  $K_m$  pour le G3P est de 12  $\mu$ M. Son activité est inhibée de façon compétitive par le D,L-glycéraldéhyde-3-phosphate avec un  $K_i$  de 0,5 mM (Lin, 1976).

### **I.1.3.3. Les voies d'assimilation du glycérol**

Les premiers travaux réalisés avec *Aerobacter aerogenes*, ancienne dénomination de *K. pneumoniae*, ont montré l'existence de deux voies parallèles d'assimilation du glycérol, l'une ayant la dihydroxyacétone comme intermédiaire métabolique, l'autre le G3P (Magasanik et coll., 1953). L'utilisation de glycérol marqué a rapidement permis de constater que l'utilisation de ces deux voies n'est pas simultanée (Rush et coll., 1957). En effet, des conditions d'oxygénation ou de respiration du milieu de culture dépend le choix de la voie métabolique impliquée (Lin et coll., 1960). Ces observations ont ensuite été approfondies essentiellement avec *E. coli* pour l'étude de la voie du G3P, et *K. pneumoniae* pour celle de la DHA.

#### ***I.1.3.3.1. La voie du glycérol-3-phosphate***

La voie du G3P, est l'unique voie de l'assimilation du glycérol chez *E. coli* (Lin, 1976). Dès son entrée dans la cellule, le glycérol est tout d'abord transformé en G3P par une glycérolkinase ATP-dépendante et activée par le cation  $Mg^{2+}$  (Lin et coll., 1962). Cette enzyme est constituée de quatre sous-unités identiques de masse moléculaire 55 KDa. Son  $K_m$  pour le glycérol est de 10 $\mu$ M (Jin et coll., 1982 ; Hayashi et Lin, 1967). La glycérol kinase est soumise à une inhibition allostérique par le fructose 1,6-diphosphate (F1,6diP) (Böck et Neidhart, 1966). De type non compétitif par rapport au glycérol, cette inhibition présente un  $K_i$  apparent de 0,5 mM (Zwaig et Lin, 1966 ; Thorner et Paulus, 1973).

#### **✓ La première étape**

La glycérol kinase est une enzyme clé du métabolisme du glycérol chez *E. coli*. En effet, sa forte affinité pour son substrat physiologique permet de piéger le glycérol dans la cellule grâce à sa conversion en G3P (Hayashi et Lin, 1965a). D'autre part, le système de contrôle de son activité par le F1,6diP permet de réguler la vitesse de conversion du glycérol (Zwaig et coll., 1970). Ainsi, une trop grande phosphorylation du substrat, provoquant une

trop forte accumulation intracellulaire de G3P toxique pour la cellule (Cozzarelli et coll., 1965), peut être évitée.

### ✓ La deuxième étape

Dans un second temps, le G3P formé est métabolisé en DHAP selon deux systèmes enzymatiques. L'un est la G3P déshydrogénase aérobie (Lin et coll., 1960) qui serait associée à la membrane plasmique et liée de façon non covalente au FAD (Lin, 1976). Cette enzyme est constituée de deux sous unités de masse moléculaire 35 KDa. Le  $K_m$  pour le G3P est de 0,8 mM. Parallèlement à ce premier système enzymatique, le G3P peut également être métabolisé par la G3P déshydrogénase anaérobie (Kistler et Lin, 1971). Cette protéine soluble requiert le FAD et le FMN comme cofacteurs (Pike et Sojka, 1975). Sa masse moléculaire est de l'ordre de 80 KDa. En présence de FAD, le  $K_m$  de cette enzyme pour le G3P est de 0,1 mM (Lin, 1976). La régulation de ces deux activités enzymatiques dépend du niveau d'oxygénation du milieu. Dans des conditions de bonne oxygénation, l'activité de la G3P déshydrogénase aérobie est à son plus haut niveau contrairement à la G3P déshydrogénase anaérobie. En anaérobiose les niveaux sont inversés en présence de fumarate (Freedberg et Lin, 1973). Contrairement à la glycérol déshydrogénase aérobie qui utilise l'oxygène, la G3P déshydrogénase anaérobie nécessite le fumarate comme accepteur final d'électrons, et semble participer à un complexe multienzymatique comprenant la fumarate réductase. De la même façon, en présence de nitrate, l'activité de la G3P déshydrogénase anaérobie est couplée à celle de la nitrate réductase et au cytochrome  $b_1$  (Lin, 1976). Cette dépendance de la protéine anaérobie envers le fumarate ou le nitrate explique l'absence de développement cellulaire d'*E. coli* sur un milieu enrichi en glycérol mais dépourvu d'accepteur final d'électrons (Saint Martin et coll., 1977).

### ✓ Organisation génomique

Au niveau génomique, les protéines de transport ainsi que celles nécessaires au catabolisme du glycérol sont codées par des gènes portés par trois opérons situés sur le régulon *glp* (Cole et coll., 1988 ; Ehrmann et coll., 1987 ; Kistler et Lin, 1971 ; Larson et coll., 1983 ; Miki et coll., 1979 ; Cozzarelli et coll., 1968 ). Il comprend :

- opéron *glpFK*, situé à 88 min sur la carte d'*E.coli*, portant les gènes de la protéine de transport du glycérol (*glpF*) et de la glycérol kinase (*glpK*).
- opéron *glpACB* (49 min) codant pour la G3P déshydrogénase anaérobie.
- opéron *glpD* (75 min) codant pour la G3P déshydrogénase aérobie.

- opéron *glpTQ* (49 min) portant le gène de la perméase du G3P et de la glycérophosphodiesterase. Bien qu'adjacent à l'opéron *glpACB*, cet opéron est transcrit de façon divergente.
- opéron *glpR* codant pour un répresseur.

Les gènes du régulon *glp* sont soumis à de multiples régulations. L'expression de ces gènes est régulée par un répresseur commun, produit du gène *glpR* (Koch et coll., 1964), et par un inducteur, le G3P (Hayashi et Lin, 1965b) ; la présence d'oxygène n'est pas nécessaire à l'induction du système *glp* (Ruch et coll., 1974). Plus récemment, Kuritzkes et coll. (1984) ont démontré que la forte expression en anaérobiose de l'opéron *glpACB* dépend de la protéine FNR, un activateur pléiotropique de gènes impliqués dans la respiration anaérobie, et d'un second mécanisme sensible à l'état d'oxydo-réduction environnemental (Jones et Gunsalus, 1987 ; Spiro et Guest, 1988). Parallèlement, la très faible expression en anaérobiose de l'opéron *glpD* résulte de l'action de répresseurs pléiotropiques, produits des gènes *arcA* et *arcB* (Iuchi et coll., 1989 ; Iuchi et Lin, 1988). En conditions aérobies, la faible expression de l'opéron *glpACB* pourrait être liée à la présence de la protéine CAP, produit du gène *crp* (Iuchi et coll., 1990 ; Shaw et coll., 1983 ; Spiro et Guest, 1987). Il apparaît donc que l'expression du régulon *glp* fait intervenir au moins trois systèmes régulateurs impliquant les modulons *crp*, *fnr* et *arc* (Lin et Iuchi, 1991).

#### ***I.1.3.3.2. La voie de la dihydroxyacétone***

A la différence d'*E. coli*, *K. pneumoniae* dispose de deux voies métaboliques permettant de réaliser l'oxydation du glycérol en DHAP (Magasanik et coll., 1953 ; Rush et coll., 1957).

#### **✓ La voie oxydative**

En anaérobiose, le glycérol est catabolisé par la voie du G3P codée par le régulon *glp* semblable à celui décrit précédemment pour *E. coli*. Par contre, l'assimilation du glycérol en conditions anaérobies a systématiquement lieu via la voie de la DHA, même en présence de G3P et de fumarate. C'est en effet uniquement après disparition de plus de 90% du glycérol du milieu de culture que la voie du G3P est induite dans ces mêmes conditions. L'effet inducteur du G3P vis à vis du régulon *glp* est donc annulé par le glycérol ou l'un des intermédiaires métaboliques de la voie de la DHA (Ruch et coll., 1974 ; Ruch et Lin, 1975).

La croissance de *K. pneumoniae* sur glycérol en conditions anaérobies et en l'absence d'accepteur final d'électrons exogène implique dans un premier temps l'intervention de la

glycérol déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante, dont le produit de la réaction, la DHA, est ensuite phosphorylée par la DHA kinase ATP-dépendante (Ruch et Lin, 1975).

### ✓ La voie réductive

L' assimilation du glycérol par la voie de la DHA ne nécessitant pas d'accepteur d'électrons exogène, le NADH produit par ces réactions est en partie régénéré par une voie parallèle qui implique la conversion du glycérol en 3-HPA suivie de sa réduction en 1,3-PPD (Abeles et coll., 1960) ou de sa déshydratation intramoléculaire (Sobolov et Smiley, 1960). La première étape de cette voie réductive implique une déshydratase coenzyme B<sub>12</sub>-dépendante (Forage et Foster, 1979 ; Toraya et coll., 1976) existant sous deux formes chez *K. pneumoniae* (Toraya et Fukui, 1977) : la diol déshydratase (EC 4.2.1.28) et la glycérol déshydratase (EC 4.2.1.30). Ces deux activités catalytiques peuvent intervenir ensemble ou indépendamment chez les bactéries du genre *Citrobacter* et *Klebsiella* (Forage et Foster, 1979 ; Toraya et coll., 1980). La seconde étape de la voie réductive de conversion du glycérol implique une réductase NADH-dépendante (Abeles et coll., 1960). Appelée dans un premier temps triméthylène glycol déshydrogénase par Forage et Foster (1982) , cette enzyme prit le nom de 1,3-propanediol NAD<sup>+</sup>: oxydoréductase ou 1,3-propanediol déshydrogénase (EC 1.1.1.202) (Johnson et Lin, 1987 ; Daniel et coll, 1995a).

### ✓ Organisation génomique

D'un point de vue génomique, l'existence d'un système *dha* (opéron ou régulon) contenant les gènes codant pour la glycérol déshydrogénase et la DHA kinase a été dans un premier temps proposée par Ruch et Lin dès 1975. L'induction de ces 2 enzymes en anaérobiose et sans accepteur d'électrons exogène fut ensuite associée aux enzymes de la voie du 1,3-PPD, simultanément induites, dont le rôle physiologique est la régénération des équivalents réducteurs. Cela a permis d'intégrer les gènes codant pour ces deux dernières protéines au système *dha* (Forage et Foster, 1982).

L'organisation du régulon *dha* comprend alors :

- le gène *dhaD* codant pour la glycérol déshydrogénase.
- le gène *dhaK* codant pour la DHA kinase.
- le gène *dhaB* codant pour la glycérol déshydratase.
- le gène *dhaT* codant pour la 1,3-propanediol déshydrogénase.
- le gène *dhaR* codant pour une protéine jouant le rôle de répresseur.

L'expression des gènes structuraux du régulon *dha* est contrôlée d'une part, par un répresseur ayant la DHA comme effecteur, et d'autre part, par répression catabolique par le glucose (Forage et Foster, 1982 ; Forage et Lin, 1982 ; Johnson et coll., 1984 ; Ruch et coll., 1974 ; Ruch et Lin, 1975). Chez *Klebsiella pneumoniae*, les gènes *dhaB* et *dhaT* sont naturellement sous contrôle de deux promoteurs différents (Skraly et coll., 1998).

#### I.1.3.4. Les voies cataboliques du glycérol

Le glycérol étant un composé présentant un degré de réduction élevé (4,67 rédoxons par mole de carbone), son assimilation en conditions anaérobies nécessite :

- la présence d'accepteurs terminaux d'électrons qui peuvent être le fumarate (Magasanik et coll., 1953), le nitrate (Inderlieb et Delwiche, 1973), le nitrite (Chatelain, 1969), le sulfate (Qatibi et Bories, 1988) ou le dioxyde de carbone (Eichler et Schink, 1984) selon les micro-organismes.
- un bilan d'oxydo-réduction équilibré, comme cela est le cas de la fermentation propionique (Leaver et coll., 1955).
- l'utilisation simultanée de voies métaboliques régénératrices d'équivalents réducteurs, telle que la voie de formation du 1,3-PPD (Abeles et coll., 1960).

Divers micro-organismes aérobies stricts ou facultatifs assimilent le glycérol par un métabolisme de type oxydatif. Le substrat est catabolisé à l'intérieur de la cellule en dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et rejoint ainsi la voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas.

Par contre, l'utilisation du glycérol par les bactéries anaérobies conduit, par l'intermédiaire du pyruvate, à la formation d'acides gras volatils (acétate, propionate, butyrate) et de solvants (éthanol, butanol, acétone). Le catabolisme fermentaire du glycérol est réalisé grâce à des voies métaboliques productrices d'énergie (sous forme d'ATP) qui génèrent une production importante d'équivalents réducteurs. Pour rétablir son équilibre d'oxydoréduction, la cellule peut éliminer l'excès de coenzymes réduits de plusieurs façons et notamment grâce à l'existence d'une voie métabolique qui conduit à la formation du 1,3-propanediol.

### I.1.3.4.1. Chez les bactéries aérobies

#### ✓ *Bacillus subtilis*

Ce micro-organisme, aérobic, est capable de se développer sur glycérol et/ou sur glycérol-3-phosphate (G3P) comme seule source de carbone et d'énergie (Lindgren et Rutberg, 1974).

Le système de perméation du glycérol chez *B. subtilis* relève de la diffusion facilitée. Le glycérol peut donc s'équilibrer de part et d'autre de la membrane (Saheb, 1972a).

Le métabolisme du glycérol, chez ce micro-organisme, est réalisé par quatre enzymes dont les gènes sont portés par des opérons différents appartenant au régulon *glp* (Beijer et coll., 1993) (Figure 3).

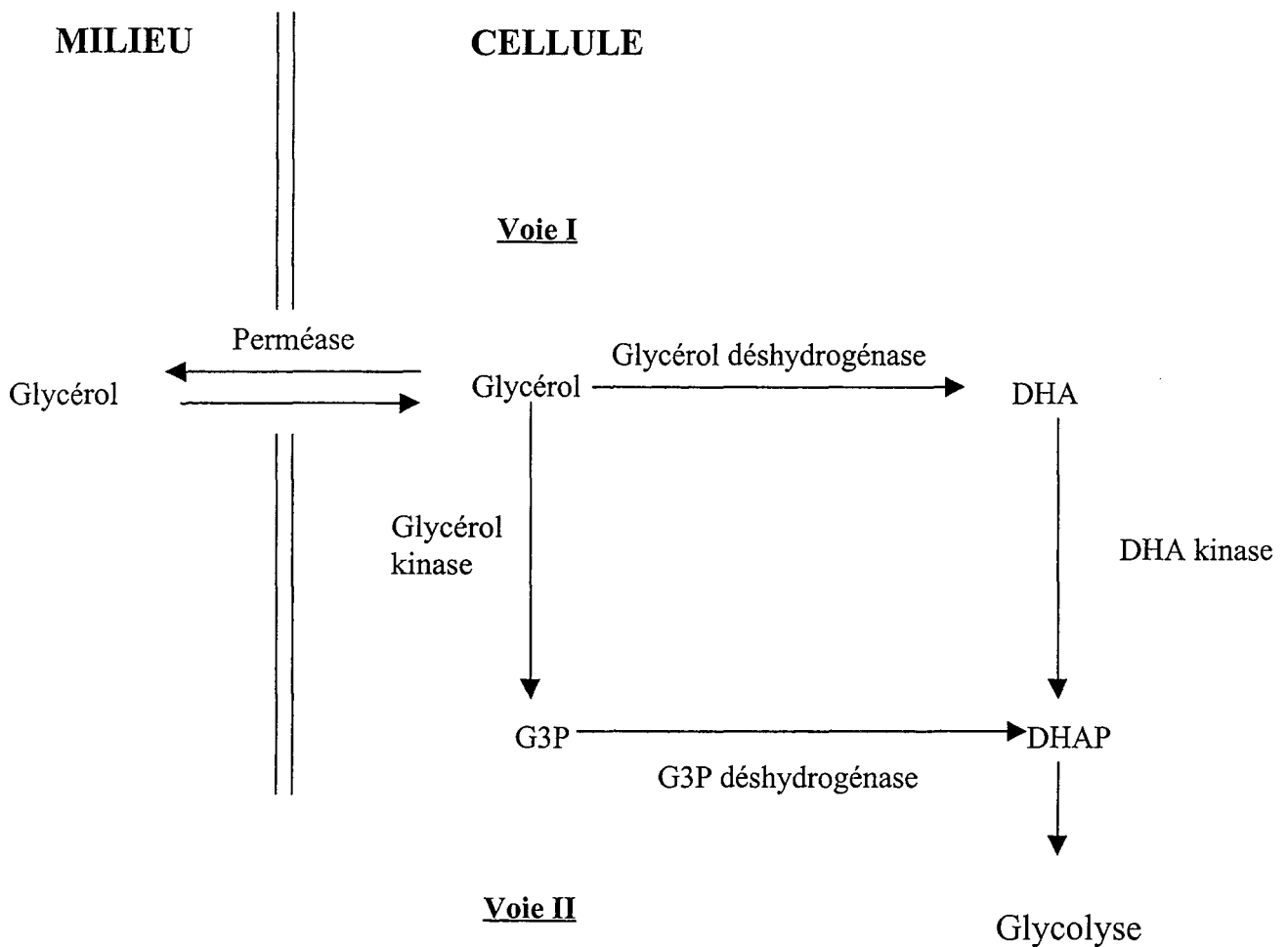


Figure 3. Catabolisme du glycérol chez *B. subtilis* (Lin, 1976).

La voie I comprend la glycérol déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante (EC 1.1.1.6 :Glycérol NAD<sup>+</sup> 2 oxydo-réductase) et la DHA kinase (EC 2.7.1.30) (Wiame et coll., 1954).

La voie II est constituée d'une glycérol kinase (EC 2.7.1.30. ATP : glycérol-3-phosphotransférase) et d'une glycérol-3-phosphate déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante (EC 1.1.1.8) (Mindich, 1968).

La glycérol kinase et la G3P déshydrogénase sont des enzymes inductibles. Leur expression est régulée par le pool intracellulaire de glycérol -3-phosphate (Oh et coll., 1973 ; Lindgren et Rutberg, 1974). Ce dernier est aussi un intermédiaire du catabolisme du glycérol (Mindich, 1968). D'après Saheb (1972b), seules les enzymes appartenant à la voie II interviennent dans la dégradation aérobie du glycérol chez *B. subtilis*. La glycérol déshydrogénase et la DHA kinase (les enzymes de la voie I), constitutives et soumises à une répression par le glucose, joueraient un rôle dans la réutilisation du 2,3-butanediol produit à partir du glucose par la bactérie, et dans la biosynthèse du glycérol, indispensable à la formation des lipides.

#### ✓ *Pseudomonas aeruginosa*

L'assimilation du glycérol chez ce micro-organisme est assurée par la voie du glycérol-3-phosphate (Tsay et coll., 1971). La glycérol kinase et la glycérol-3-phosphate deshydrogénase sont induites par le glycérol seul (Williams et coll., 1994).

#### ✓ Genre *Mycobacterium*

Le glycérol est le substrat le plus efficace pour la stimulation de la consommation d'oxygène chez *Mycobacterium tuberculosis*. Quatre enzymes impliquées dans la dégradation aérobie du glycérol ont été mises en évidence chez cette bactérie (Goldman, 1963; Winder et Brennan, 1966): glycérol oxydo-réductase NADP-dépendante, DHA kinase, G3P déshydrogénase, G3P synthétase.

Une activité glycérol kinase a également été observée dans les extraits acellulaires. La plus forte affinité pour la DHA de l'activité kinase contenue dans les extraits acellulaires par rapport au glycérol et l'observation dans les cellules d'une activité glycérol déshydrogénase trois fois plus importante que l'activité G3P déshydrogénase, sont des arguments favorables à une dégradation du glycérol par déshydrogénation suivie d'une phosphorylation. Cependant, le rôle des autres enzymes et le mode de régulation du métabolisme du glycérol chez ce micro-organisme n'ont pas été clairement précisés.

Chez *Mycobacterium smegmatis*, des activités glycérol kinase, glycérol-3-phosphate déshydrogénase, et glycérol oxydo-réductase ont été détectées (Hunter, 1953; Winder et O'Hara, 1964).

✓ *Nocardia asteroides*

La dégradation du glycérol chez ce micro-organisme présente la particularité d'être contrôlée par la pénétration du substrat dans la cellule, réalisée par diffusion facilitée (la vitesse d'entrée est la vitesse limitante du catabolisme). A l'intérieur de la cellule, le glycérol est phosphorylé puis oxydé (Calmes et Deal, 1972).

✓ *Halobacterium cutirubrum*

Cette bactérie halophile est capable de se développer sur glycérol en présence de NaCl 4M. La première étape d'assimilation du substrat conduit à la formation de DHAP par une glycérol kinase et une G3P déshydrogénase à NAD<sup>+</sup> (Wassef et coll., 1970).

#### *I.1.3.4.2. Chez les bactéries anaérobies facultatives*

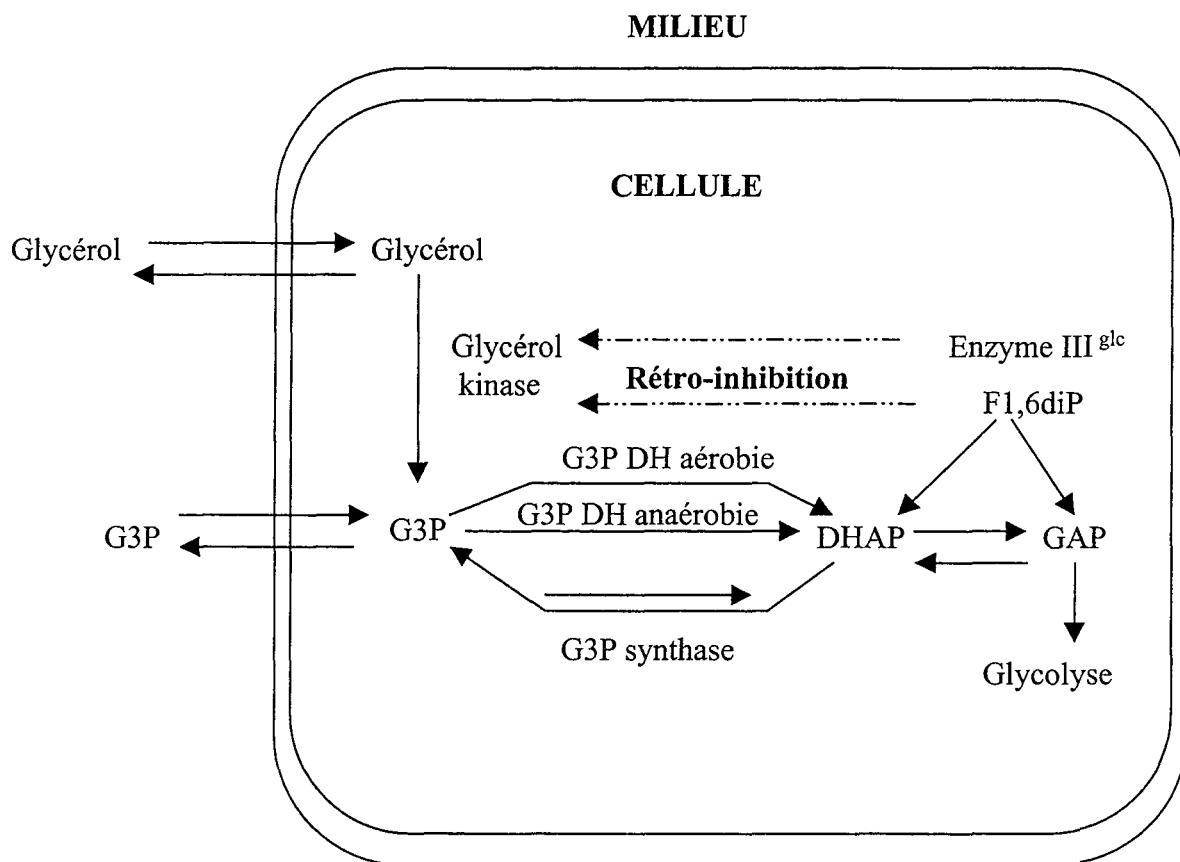
✓ *Escherichia coli*

*E. coli* peut se développer sur un milieu comprenant du glycérol et du G3P comme seules sources de carbone et d'énergie en aérobiose. Mais en anaérobiose, la croissance d'*E. coli* sur glycérol nécessite la présence d'un accepteur d'électrons comme le fumarate (Lin, 1976). Le métabolisme du glycérol se présente de la manière suivante (**Figure 4**).

L'entrée du glycérol dans la bactérie se fait par diffusion facilitée grâce à une perméase (Bovell et coll., 1963 ; Richey et Lin, 1972). Le G3P pénètre aussi dans la cellule par l'intermédiaire d'une perméase mais son accumulation serait dépendante de la force promotrice (Lin, 1976).

A l'intérieur de la cellule, le glycérol est, tout d'abord, transformé en G3P par une glycérol kinase ATP-dépendante et activée par l'ion Mg<sup>2+</sup>. Le G3P est ensuite métabolisé en DHAP soit, par une déshydrogénase "aérobie" associée à la membrane plasmique et liée de façon non covalente au FAD, son site catalytique n'étant pas accessible par la surface externe de la membrane, soit par une déshydrogénase "anaérobie". Cette dernière requiert le FAD et le FMN comme cofacteurs (Kistler et coll., 1969 ; Pike et Sojka, 1975).





**Figure 4.** Métabolisme du glycérol et du G3P chez *E. coli*

(Lin, 1976 ; Iuchi et coll., 1990).

**Abréviations:** DH: déshydrogénase, GAP: glycéraldéhyde-3-phosphate,

DHAP: dihydroxyacétone phosphate,

Enzyme III<sup>glc</sup>: protéine III du système de transport PTS.

La régulation de ces deux activités enzymatiques serait contrôlée par "répression respiratoire". La déshydrogénase aérobie utilise obligatoirement l'oxygène comme accepteur final d'électrons alors que la glycérol déshydrogénase anaérobie nécessite le fumarate ou le nitrate (Asnis et Brodie, 1953, Asnis et coll., 1956 ; Saint Martin et coll., 1977).

Le métabolisme du glycérol chez *E. coli* est soumis à deux types de régulation :

**(1) une régulation au niveau de l'expression des gènes:**

En effet, les trois opérons possèdent un répresseur unique, produit du gène *glpR*. Le glycérol, et surtout le G3P, sont les inducteurs de ce système (Koch et coll., 1964).

Cependant, une expression différentielle des gènes du système *glp* se produit du fait de

la plus forte affinité du répresseur pour l'opérateur de l'opéron *glpD* et de la relative insensibilité du gène *glpD* à la répression catabolique par le glucose (Freedberg et Lin, 1973).

## **(2) une régulation au niveau enzymatique:**

La glycérol kinase est soumise à une rétro-inhibition de type non compétitif par le fructose-1,6-diphosphate (FDP) (Böck et Neidhardt, 1966). Thorner et Paulus (1973) ont montré que la valeur du  $K_m$  pour le glycérol (0,1 mM) n'était pas modifiée par la présence de composés tels que le fructose-diphosphate, le  $K_i$  étant de 0,5 mM. Cette protéine est un élément clé du métabolisme du glycérol chez *E.coli* car elle exerce un contrôle, par son niveau d'activité, sur la dégradation du substrat (Zwaig et coll., 1970) et parce qu'elle permet de piéger le glycérol dans la cellule (Hayashi et Lin, 1965a ; 1965b). Ainsi lorsque la concentration externe en glycérol devient importante, une trop grande phosphorylation du substrat en G3P, toxique pour la cellule, peut être évitée. Donc, la répression catabolique et le contrôle cinétique de la glycérol kinase influencent la vitesse de production de G3P qui est l'inducteur du système. Il a été montré plus tard que l'activité de la glycérol kinase est aussi inhibée par l'enzyme III<sup>glc</sup> (appelée aussi protéine IIA) du système PTS sous sa forme non phosphorylée (DeBoer et coll., 1986) ce qui explique pourquoi le glucose freine l'utilisation du glycérol chez *E.coli*.

Les protéines de transport ainsi que celle nécessaires au catabolisme du glycérol sont codées par des gènes portés par trois opérons différents (Cozzarelli et coll., 1968) formant le régulon *glp* (glycérophosphate).

- opéron *glp* F, K

*glpK* : glycérol kinase

*glpF* : protéine facilitant le transport du glycérol

- opéron *glp* T, A

*glpT* : protéine facilitant le transport du G3P

*glpA* : G3P déshydrogénase anaérobie

- opéron *glp* D,R

*glpD* : G3P déshydrogénase aérobie

*glpR* : gène codant pour le répresseur du régulon *glp*

### ✓ *Klebsiella pneumoniae*

Les premières études réalisées par Magasanik et coll. (1953) ont permis de montrer que *K. pneumoniae*, d'abord répertorié sous le nom d'*Aerobacter aerogenes*, est capable de fermenter le glycérol ainsi que le G3P et la DHA. En aérobiose, la croissance de la bactérie en présence de ces divers substrats dépend seulement du degré d'aération du milieu (Lin et coll., 1960). L'assimilation anaérobie du glycérol ne nécessite aucun accepteur d'hydrogène exogène alors que pour le G3P, la présence du fumarate est indispensable (Ruch et coll., 1974). La DHA peut être aussi utilisée, en conditions anaérobies, comme source de carbone et d'énergie. Par contre, la croissance aérobie de *K. pneumoniae* en présence de ce composé est controversée car observée seulement dans une étude de Lin et coll. (1960) et non dans deux autres travaux (Magasanik et coll., 1953 ; Ruch et coll., 1974).

L'existence de deux voies possibles d'assimilation du glycérol chez ce micro-organisme a été soulevée pour la première fois en 1953 par Magasanik et coll. et confirmée ultérieurement par Ruch et coll. (1957).

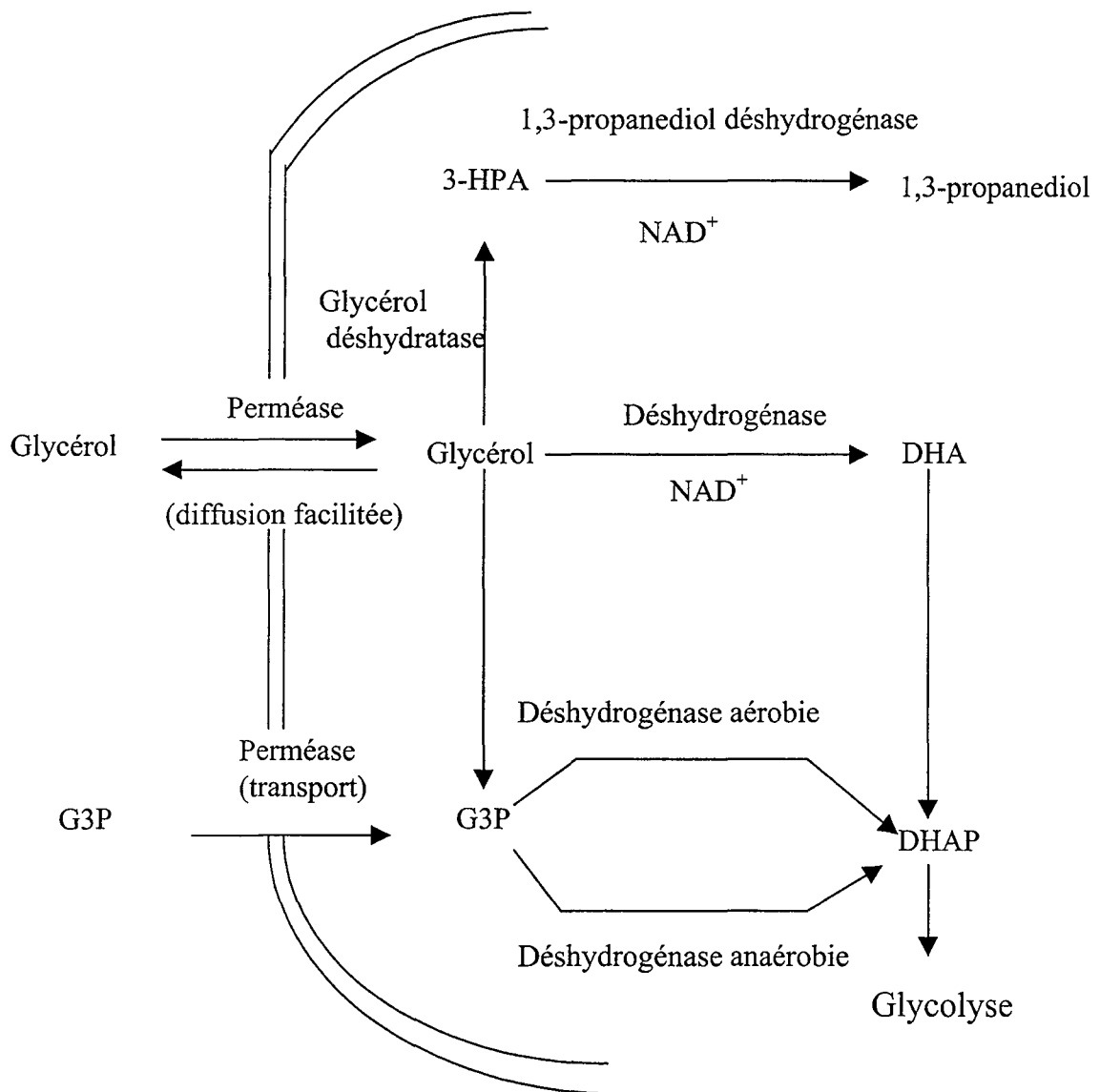
Forage et Lin (1982) ont décrit le système d'assimilation du glycérol chez *K. pneumoniae* 1033 (**Figure 5**).

La fermentation du glycérol par *K. pneumoniae* conduit à la production d'acétate, de formiate, de lactate, de succinate, d'éthanol, de 2,3-butanediol et de gaz (CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>). L'acétate est majoritairement produit par cette souche et sa synthèse représente la principale source d'énergie car 17 à 25% du glycérol assimilé sont distribués dans cette voie (Zeng et coll., 1993). La synthèse de lactate, de succinate et de 2,3-butanediol ne représente généralement pas plus de 3% du glycérol métabolisé et est légèrement favorisée par des conditions de culture en excès de substrat (Ogbe Solomon et coll., 1994; Zeng et coll., 1993). L'éthanol est, par contre, produit dans des conditions de limitation par le glycérol et à un faible taux de croissance. Il représente alors jusqu'à 4% du glycérol dégradé. Cependant, en excès de glycérol et à fort taux de dilution, sa synthèse est très fortement réduite pour ne plus représenter que 2% du glycérol (Zeng et coll., 1993). Enfin, de très faibles concentrations d'acétoïne, un intermédiaire de la voie de formation du 2,3-butanediol, ont également été signalées dans ces mêmes conditions de culture (Ogbe Solomon et coll., 1994).

En présence d'un accepteur d'électrons exogène, le glycérol est d'abord phosphorylé en G3P par une kinase ATP-dépendante. Le G3P est ensuite converti en DHAP par une déshydrogénase aérobie, si on est en présence d'oxygène moléculaire, ou par une déshydrogénase anaérobie si le fumarate (ou le nitrate) est présent. Le G3P exogène peut

aussi être utilisé comme substrat. Les gènes codant pour ces protéines font partie du régulon *glp* semblable à celui précédemment décrit chez *E.coli*.

La glycérol kinase catalyse le transfert stéréospécifique du groupe phosphorylé terminal de l'ATP à des groupements hydroxyle du substrat, formant ainsi le G3P. La valeur du  $K_m$  apparent pour son substrat physiologique est de 10  $\mu\text{M}$  (Jin et coll., 1982).



**Figure 5.** Métabolisme du glycérol et du G3P chez *K. pneumoniae* (Forage et Lin, 1982).

En anaérobiose et en absence d'un accepteur d'électrons exogène, *K. pneumoniae* utilise un autre système composé de quatre enzymes, la glycérol déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante qui oxyde le glycérol en DHA puis cette dernière est phosphorylée en DHAP par la DHA kinase ATP-dépendante. La glycérol déshydratase B<sub>12</sub>-dépendante convertit le glycérol en 3-HPA, ce dernier sera réduit en 1,3-propanediol par la 1,3-propanediol déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante.

Les gènes codant pour la glycérol déshydrogénase, la DHA kinase, la glycérol déshydratase et la 1,3-propanediol déshydrogénase font partie du régulon *dha*. Ce régulon a été cloné et exprimé chez *E. coli* par Tong et coll. (1991).

Les gènes impliqués dans la production de 1,3-PPD chez *K. pneumoniae*, *dhaB*, qui code pour la glycérol déshydratase, et *dhaT*, qui code pour la 1,3-PPD oxydoréductase, sont naturellement sous le contrôle de deux promoteurs différents et sont transcrits dans différentes directions. Ces gènes sont reconfigurés dans un opéron contenant *dhaB* suivi par *dhaT* sous le contrôle d'un seul promoteur.

Il a été établi que la modulation entre les deux voies du métabolisme du glycérol dépendait du degré d'aération du milieu (Neijssel et coll., 1975). Dans des conditions aérobies, la bactérie utiliserait la voie du G3P alors qu'en anaérobiose, seule la voie ayant la DHA comme intermédiaire serait induite. Le système de régulation de ces deux voies métaboliques est en fait très complexe puisqu'il fait appel à cinq mécanismes de contrôle différents, agissant soit au niveau de l'expression des gènes, soit directement au niveau des protéines catalytiques présentes dans la bactérie.

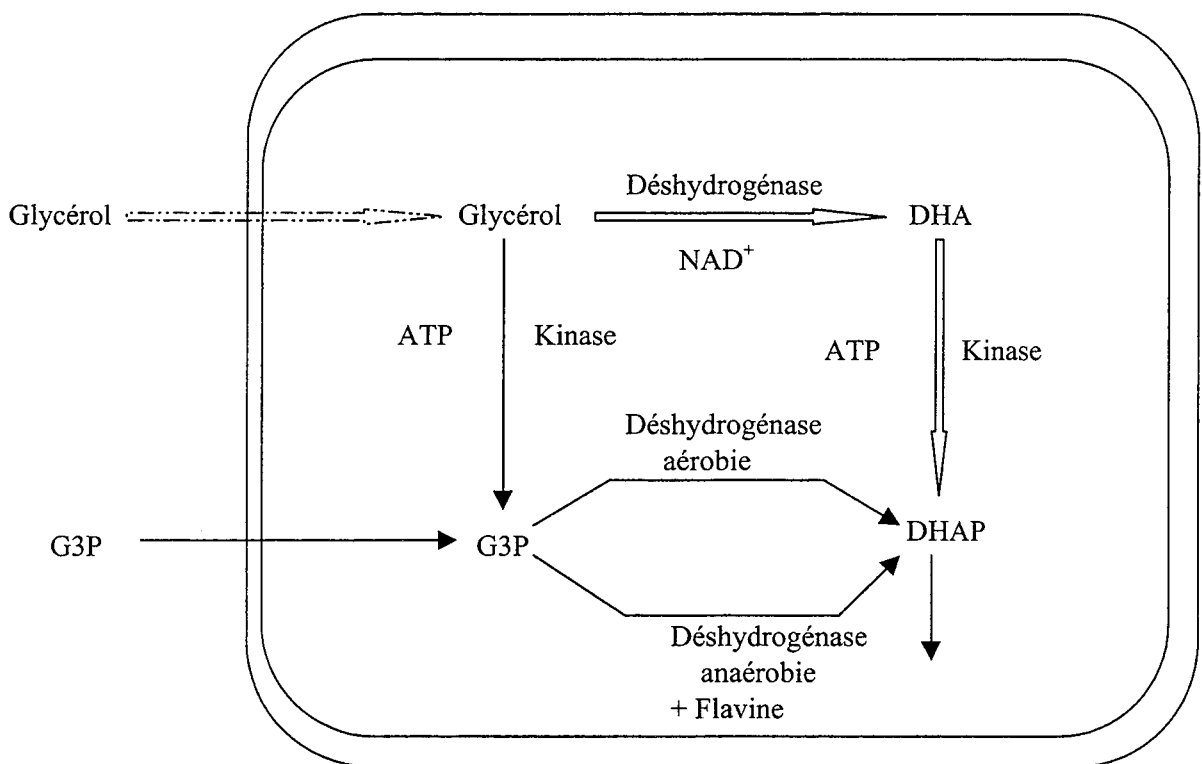
1. Les deux voies métaboliques sont sous le contrôle génétique de protéines de régulation différentes (Ruch et Lin, 1975) et possédant deux inducteurs : le G3P pour le régulon *glp* et la DHA pour le régulon *dha* (Ruch et coll., 1974).
2. L'expression de ces deux voies est également contrôlée par la respiration (répression de l'une ou de l'autre en fonction des conditions d'oxygénation).
3. La glycérol déshydrogénase et la glycérol kinase sont soumises à une forte répression catabolique par le glucose (Ruch et Lin, 1975).
4. L'activité de la glycérol kinase est rétro-inhibée par le fructose-1,6-diphosphate (Ruch et coll., 1974).
5. L'inactivation irréversible de la glycérol déshydrogénase dans des conditions aérobies est un mécanisme de régulation du catabolisme de ce substrat (Lin et coll., 1960).

✓ *Klebsiella aerogenes*

Les études réalisées par Ruch et coll., (1974) ont permis de montrer que *K. aerogenes*, est capable de fermenter le glycérol selon deux voies métaboliques (**Figure 6**), une voie sous des conditions aérobies et l'autre voie sous des conditions anaérobies.

En aérobiose, le glycérol est phosphorylé par une ATP kinase, le produit, le glycérol-3-phosphate (G3P) est ensuite converti en dihydroxyacétone phosphate par une déshydrogénase. En anaérobiose, le glycérol est d'abord déshydrogéné par une déshydrogénase à  $\text{NAD}^+$ . Le produit, dihydroxyacétone, est ainsi phosphorylé par une ATP kinase.

Les enzymes impliquées dans les deux voies métaboliques sont induites durant la croissance sur glycérol.



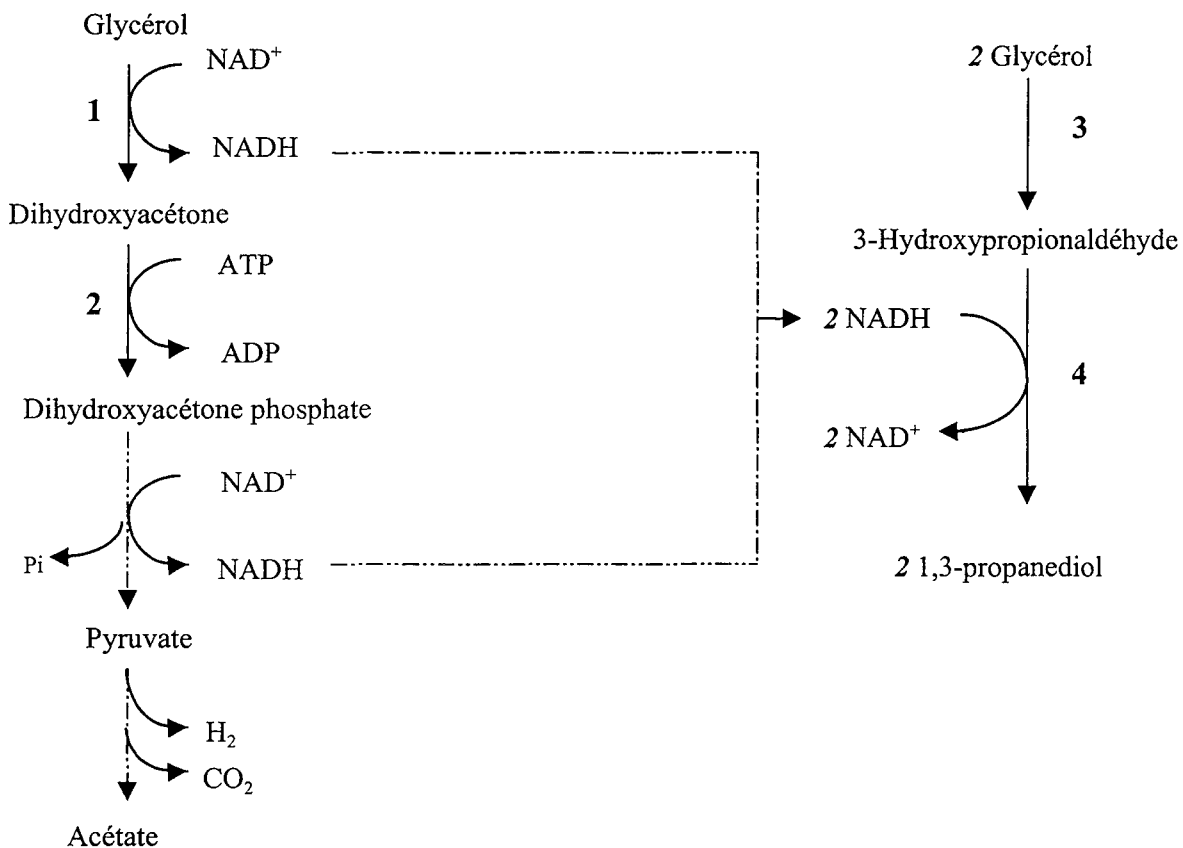
**Figure 6.** Métabolisme du glycérol et du glycérol-3-phosphate chez *K. aerogenes* (d'après Ruch et coll., 1974).

Les flèches simples indiquent le catabolisme du glycérol et du G3P en aérobiose et du G3P en anaérobiose. Les flèches doubles indiquent le catabolisme du glycérol en anaérobiose.

**Abréviations:** G3P: glycérol-3-phosphate ; DHA: dihydroxyacétone ; DHAP: dihydroxyacétone phosphate ;  $\text{NAD}^+$ : nicotinamide adenine dinucléotide ; ATP: adénosine triphosphate.

✓ *Citrobacter freundii*

Mickelson et Werkman (1940) ont établi qu'en anaérobiose, *Citrobacter freundii* se développait sur le glycérol et que la croissance était accompagnée de la production de 1,3-propanediol, suggérant que l'utilisation de cette voie métabolique permet la régénération du NADH produit au niveau de la glycolyse. Plus récemment, la synthèse de 1,3-PPD a également été signalée chez *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii* et *C. genomospecies* 10 and 11 (Bouvet et coll., 1995). Ces auteurs ont proposé que ce micro-organisme utilisait, par l'intermédiaire du 3-HPA, le glycérol en tant qu'accepteur final des équivalents réducteurs qui sont fournis en excès lors de la conversion du glycérol, via le pyruvate, en acides et alcools. La conversion du glycérol en pyruvate par la voie de la glycolyse conduit à la formation d'une mole d'ATP et de 2 moles de NADH (Figure 7).



**Figure 7.** Maintien de l'équilibre d'oxydoréduction chez *Citrobacter freundii* par association des voies métaboliques de production d'acide acétique et de 1,3 propanediol (Mickelson et Werkman, 1940).

1. Glycérol déshydrogénase. 2. Dihydroxyacétone kinase. 3. Glycérol déshydratase.
4. 1,3-propanediol déshydrogénase.

Le pyruvate peut, soit être directement transformé en acide lactique (réaction couplée à l'oxydation de 1 mole de NADH par mole de pyruvate), soit être carboxylé et réduit pour produire l'acide succinique par une voie métabolique consommant 2 moles de NADH. La synthèse des acides acétique et formique est liée au clivage de la pyruvate lyase (Cooper, 1984).

La fermentation du glycérol par *C. freundii* conduit à la synthèse d'acétate, de formiate, de lactate, de pyruvate, d'éthanol et de gaz (CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>) (Boenigk et coll., 1993; Homann et coll., 1990). Les voies métaboliques utilisées sont semblables à celles décrites précédemment pour *K. pneumoniae*. La production d'éthanol est beaucoup plus faible que dans le cas de *K. pneumoniae* car elle n'excède pas 10% du glycérol assimilé quelles que soient les conditions de culture. La voie du 1,3-PPD est donc systématiquement la principale voie de régénération des équivalents réducteurs.

La nécessité pour la cellule de maintenir un équilibre d'oxydo-réduction par une distribution régulée des flux carbonés à travers le métabolisme a été soulignée par Homann et coll. (1990) avec les souches *C. freundii* Zu et *C. freundii* K2. Des rendements molaires de conversion du glycérol en 1,3-PPD de l'ordre de 65% ont pu être obtenus avec l'acétate comme principal co-produit.

Le régulon *dha* de *Citrobacter freundii*, comprenant les quatre enzymes: glycérol déshydrogénase, dihydroxyacétone kinase, glycérol déshydratase et 1,3-PPD déshydrogénase, a été cloné chez *E. coli* par Daniel et Gottschalk (1992). Ces auteurs montrent qu'en diminuant la température de croissance d'*E. coli* de 37°C à 28°C, l'activité spécifique de la glycérol déshydratase (*dhaB*) a doublé alors que l'activité des trois autres enzymes du régulon *dha* n'a pas varié (Daniel et Gottschalk, 1992). Deux hypothèses sont soumises :

- soit l'expression du gène codant pour la glycérol déshydratase est dépendante de la température.
- soit l'enzyme est rapidement dégradée.

Ces mêmes auteurs suggèrent que pour avoir une synthèse de la glycérol déshydratase coenzyme B<sub>12</sub>-dépendante chez *E. coli* deux conditions sont nécessaires :

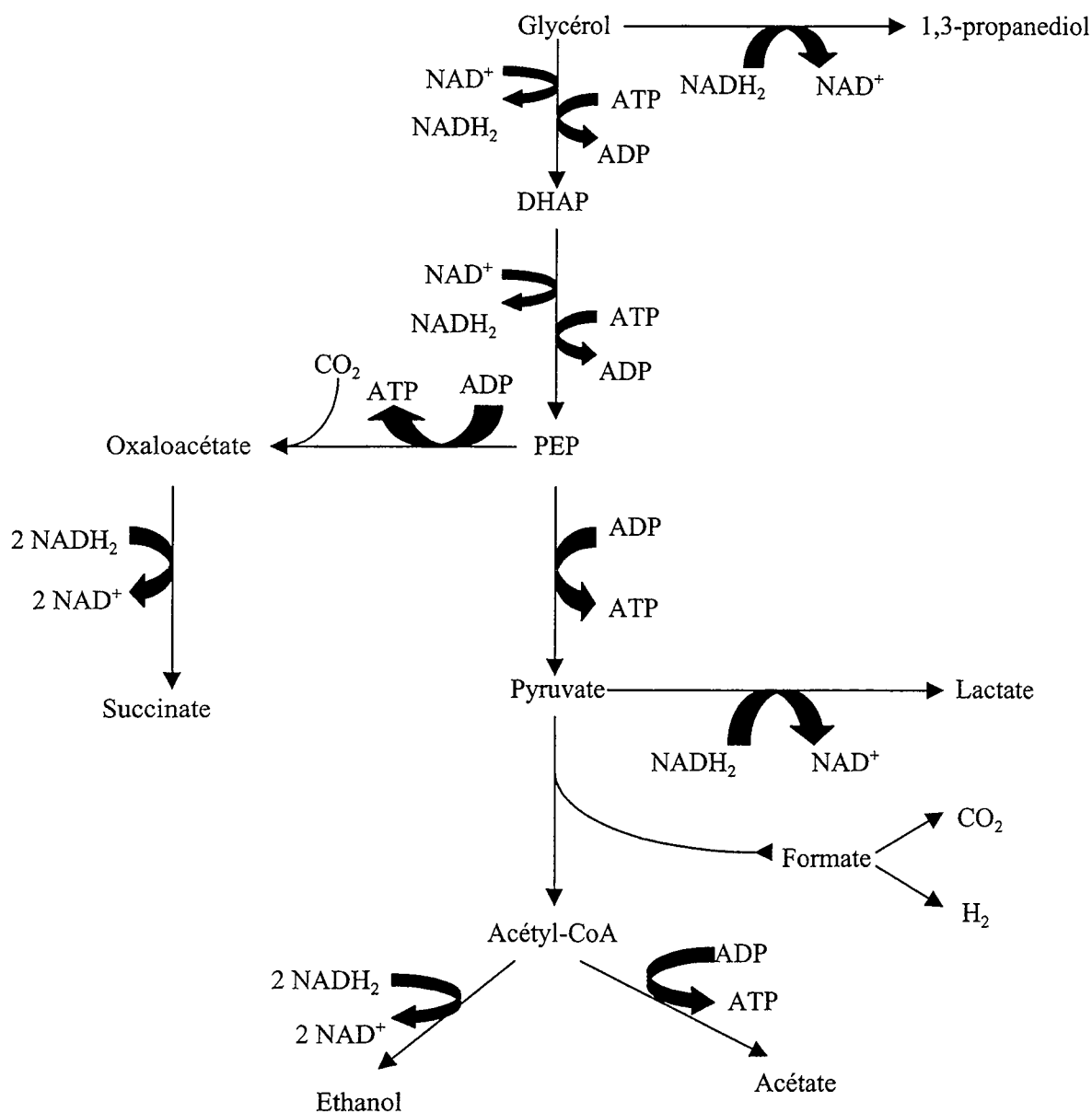
- il faut diminuer la température de croissance d'*E. coli*.
- il faut ajouter des corrinoïdes dans le milieu de croissance.

#### ✓ *Enterobacter agglomerans*

Barbirato et coll. (1995) ont montré que la fermentation du glycérol par la souche *E. agglomerans* se caractérise par une production systématiquement majoritaire de 1,3-PPD et



par la formation de plusieurs co-produits que sont les acides acétique, formique, lactique et succinique et l'éthanol (**Figure 8**).



**Figure 8.** Métabolisme du glycérol chez *E. agglomerans* (d'après Barbarito et coll., 1995).

**Abréviations:** DHAP: dihydroxyacétone phosphate ;  
PEP: phosphoénolpyruvate.

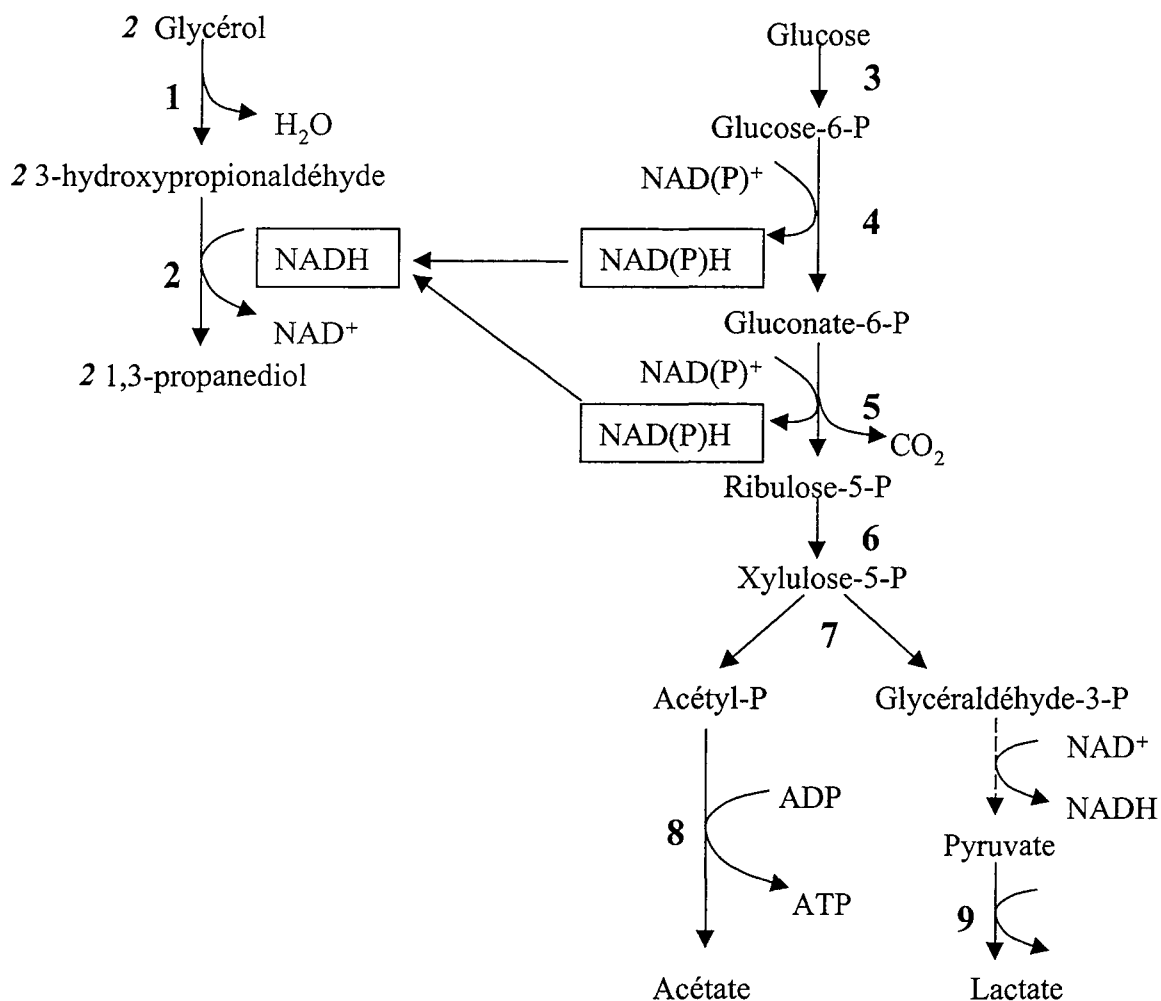
Le 2,3-butanediol, à l'état de traces, a également été identifié ultérieurement. La production de gaz (CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>) est systématiquement très faible. Un tel profil fermentaire est similaire à celui de *K. pneumoniae* cultivée dans des conditions analogues. *E. agglomerans* se distingue toutefois de cette dernière par sa production faible de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> sur glycérol.

D'un point de vue biochimique, la voie du G3P n'est pas utilisée par *E. agglomerans* pour métaboliser le glycérol en anaérobiose. Le glycérol entrant dans la cellule est ainsi canalisé vers la glycolyse exclusivement via la voie de la DHA qui implique la glycérol déshydrogénase et la DHA kinase. La voie de formation du 1,3-PPD implique la glycérol déshydratase et la 1,3-PPD déshydrogénase. La présence de ces activités catalytiques est en effet observée exclusivement lors des cultures sur glycérol. La régulation transcriptionnelle de ces quatre enzymes s'apparente alors à celle décrite chez *K. pneumoniae* du fait des rôles inducteur du glycérol et répresseur du glucose. Chez *E. agglomerans* la voie de 1,3-PPD a deux fonctions physiologiques selon les conditions de cultures:

- (1) Lorsque la vitesse de l'assimilation du glycérol est faible, le rôle de la voie du 1,3-PPD se limite à la régénération des équivalents réducteurs consommés dans la glycolyse. Une part majoritaire du glycérol est canalisée vers la glycolyse et la voie de l'éthanol participe fortement à l'équilibre d'oxydoréduction. La voie du 1,3-PPD peut alors être considérée comme limitante (Boenigk et coll., 1993). Son activité, dépendante du flux glycolytique, est maintenue par les besoins en NAD<sup>+</sup>.
- (2) Lorsque la vitesse de l'assimilation du glycérol est élevée, une part majoritaire du glycérol est orientée vers la voie du 1,3-PPD. L'étape limitante devient la GAP déshydrogénase. Le rôle de la voie du 1,3-PPD est de générer des équivalents réducteurs pour favoriser et accélérer le flux carboné au travers de la glycolyse. Ce rôle de "pacemaker" ou d'activateur catabolique peut également justifier l'utilisation du système PDH, générant du NADH, par la cellule dans ces conditions de culture.

#### ✓ Genre *Lactobacillus*

Schütz et Radler (1984) ont montré que des lactobacilles (*L. brevis* et *L. buchneri*) catabolisaient le glycérol uniquement en présence de glucose. Cette particularité métabolique provient en fait de l'existence, chez ces micro-organismes, d'une seule voie métabolique de dégradation du glycérol, conduisant à la formation de 1,3-propanediol qui n'est pas couplée aux voies conventionnelles d'assimilation hétérolactiques des substrats et qui n'est pas génératrice d'énergie ni consommatrice d'équivalents réducteurs (**Figure 9**).



**Figure 9.** Co-métabolisme du glycérol et du glucose chez le genre *Lactobacillus* (Schütz et Radler, 1984).

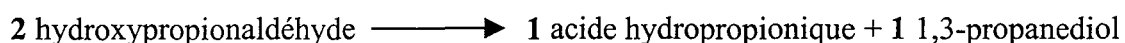
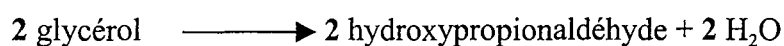
1. Glycérol déshydratase. 2. 1,3-PPD déshydrogénase. 3. Hexokinase.
4. Glucose-6-P déshydrogénase. 5. Gluconate-6-P déshydrogénase.
6. Ribulose-3-P épimérase. 7. Phosphocétolase. 8. Acétate kinase
9. Lactate déshydrogénase.

Ces caractéristiques métaboliques empêchent les lactobacilles de se développer sur glycérol seul. En présence de glucose, les bactéries assurent leur besoin énergétique par dégradation hétérolactique du substrat osidique et utilisent les coenzymes réduits formés pour la réduction du glycérol qui est alors assimilé (Slininger et coll., 1983).

Incubée en présence de glycérol et sans autre source carbonée, *L.reuteri* synthétise la reutérine (Talarico et coll., 1988) identifiée comme du 3-HPA en équilibre avec ses formes hydratée et polymérisée (Talarico et Dobrogosz, 1989). Cette accumulation résulte de l'incapacité de la souche à maintenir son équilibre d'oxydoréduction.

*Lactobacillus collinoides* est aussi capable de transformer le glycérol en 3-HPA (Sauvageot et coll., 2000).

Sobolov et Smiley (1960) suggèrent l'existence d'une dismutation aldéhydique chez *Lactobacillus* 208A se développant sur glycérol comme seule source de carbone et d'énergie puisqu'il y a formation équimolaire d'acide 3-hydroxypropionique et de 1,3-propanediol.



Les voies métaboliques impliquées dans cette transformation équilibrée en termes d'oxydoréduction ainsi que celles assurant la synthèse d'énergie nécessaire à la croissance n'ont pas toutefois été précisées.

#### ✓ *Salmonella typhimurium*

Le système enzymatique de dégradation du glycérol chez cette bactérie pathogène est fortement similaire à celui d' *E. coli*, en ce qui concerne les propriétés des protéines catalytiques, la localisation des gènes structuraux et la régulation de leur expression (Aceves-Pina et coll., 1974).

#### ✓ Genre *Streptococcus*

Il a été démontré que deux streptocoques (*Streptococcus faecalis* et *Streptococcus faecium*) étaient capables de croître sur glycérol. En aérobiose, la conversion du substrat est initiée par une kinase; le G3P formé est ensuite transformé en DHAP par une oxydase à FAD, soluble, possédant la caractéristique de réagir directement avec l'oxygène, les deux micro-organismes ne produisant pas de cytochrome (Jacobs et Vandemark, 1960a).

Chez *Streptococcus faecalis*, le catabolisme du glycérol est induit par le substrat lui-même et nécessite un cofacteur acide lipoïque (Claridge et Hendlin, 1962).

L'assimilation du glycérol en anaérobiose par *Streptococcus faecalis* est réalisée par le système: glycérol déshydrogénase, DHA kinase. La régénération des équivalents réducteurs

(NADH) formés au cours de la déshydrogénation s'effectue suivant un double système: réduction de la riboflavine, du FMN ou du FAD aux dépens du NADH et réoxydation des flavines réduites en utilisant le fumarate comme accepteur final d'électrons (Jacobs et Vandermark, 1960b).

#### ✓ Genres *Gluconobacter* et *Acetobacter*

La plupart des bactéries acétiques (genres *Gluconobacter* et *Acetobacter*) sont capables de se développer à partir de glycérol comme seule source de carbone et d'énergie.

La transformation du glycérol en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O, qui se déroule au niveau du cytoplasme, débute par la conversion du substrat en DHAP réalisée suivant deux voies métaboliques (King et Cheldelin, 1952a; Hauge et coll., 1955).

La première voie met en jeu une glycérol déshydrogénase NAD<sup>+</sup> et ATP indépendante. Le 2,4-dinitrophénol, inhibiteur de la biosynthèse d'ATP, n'a pas d'effet sur cette oxydation. Une kinase, ATP-dépendante (K<sub>m</sub> = 0,33 mM) et activée par l'ion Mg<sup>2+</sup>, phosphoryle la DHA formée (King et Cheldelin, 1952b).

La cellule dispose également d'une voie deuxième voie d'oxydation du glycérol dépendante en phosphate. Dans ce cas, le substrat est déshydrogéné par une protéine catalytique à NAD<sup>+</sup>, après phosphorylation en G3P (action d'une kinase dépendante en ATP et Mg<sup>2+</sup>).

L'oxydation complète d'une molécule de DHAP conduit à la formation de trois molécules de CO<sub>2</sub>, de six molécules de H<sub>2</sub>O, et d'une molécule de phosphate inorganique. Elle s'accompagne d'une consommation de trois molécules d'oxygène moléculaire (quotient respiratoire CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>=1) (King et Cheldelin, 1952b; Klungsoyr et coll., 1957).

#### ✓ Genres *Acetobacterium* et *Sporomusa*

Les genres *Acetobacterium* et *Sporomusa* sont des bactéries homoacétogènes. *Acetobacterium carbinolicum* et *Acetobacterium woodii* utilisent le glycérol comme source de carbone et d'énergie en présence de CO<sub>2</sub> comme accepteur final d'électrons (Eichler et Schink, 1984; Balch et coll., 1977). Les deux substrats sont transformés en acétate. Emde et Schink (1987) ont établi que des quantités significatives de 1,3-PPD étaient formées à partir de glycérol par *Acetobacterium sp.* Cette production de 1,3-PPD correspond probablement à un métabolisme secondaire de la fermentation du substrat et à la présence d'électrons énergétiquement disponibles issus du métabolisme primaire du substrat. La fermentation du glycérol et du CO<sub>2</sub> en acétate est une réaction exergonique de variation d'énergie libre égale à 151,7 KJ/mole. La production d'ATP associée à cette conversion est d'environ de 2 moles par

mole de glycérol. L'ATP est surtout synthétisé au cours de la phosphorylation liée au substrat de la voie glycolytique et durant l'action de l'acétate kinase. Il y a aussi production d'une fraction d'ATP durant la réduction du CO<sub>2</sub> en acétate. L'acide acétique est excrété sous forme neutre, par un procédé ne dépendant pas d'un transport de protons et ne produisant pas d'énergie (Emde et Schink, 1987). *Sporomusa acidovorans* oxyde le glycérol en acétate en présence de CO<sub>2</sub> comme accepteur final d'équivalents réducteurs. Le 1,3-PPD est également synthétisé mais en faible quantité (Ollivier et coll., 1985).

*Sporomusa paucivorans* assimile faiblement le glycérol. La conversion complète du substrat est réalisée par la bactérie dans deux cas (Hermann et coll., 1987):

- (1) au cours de culture sous CO<sub>2</sub> en présence de tampon bicarbonate. Le bilan de la conversion est alors identique à celui établi pour les bactéries homoacétogènes du genre *Acetobacterium*.
- (2) lorsque le micro-organisme est cultivé en association syntrophique avec *Methanobacterium formicicum*. Dans ce cas, la bactérie méthanogène joue le rôle d'accepteur final d'électrons, en oxydant l'excès d'équivalents réducteurs en méthane. Le CO<sub>2</sub> dégagé au cours de l'oxydation du glycérol en acétate est utilisé comme co-substrat.

Ces travaux montrent que la présence d'un système externe d'accepteur d'électrons (CO<sub>2</sub> ou bactérie méthanogène) est nécessaire à la dégradation du glycérol chez *Sporomusa paucivorans*.

### ✓ Genre *Propionibacterium*

Les bactéries propioniques (*Propionibacterium arabinosum*, *Propionibacterium shermanii*) transforment le glycérol en acide propionique (Leaver et coll., 1955).

L'utilisation de glycérol marqué avec C<sub>14</sub> et des études enzymatiques (Gottschalk et Andreesen, 1979) ont permis d'établir que la dégradation du glycérol en propionate avait pour intermédiaire l'acide succinique. Le glycérol est oxydé en pyruvate à raison de 2 moles de NADH formé par mole de pyruvate formé. Le pyruvate est réduit ensuite en acide propionique, cette réduction est réalisée par l'intermédiaire de composés en C<sub>4</sub>, ce qui implique une fixation de CO<sub>2</sub> (d'origine gazeuse ou non) sur l'acide pyruvique par une transcarboxylase. Elle permet la régénération des coenzymes à raison de 2 moles de NADH consommé par mole de pyruvate transformé.

De ce fait, la conversion du glycérol en propionate permet d'assurer à elle seule la production d'énergie nécessaire au développement cellulaire (3 moles d'ATP formé /mole de glycérol consommé) et au maintien de l'équilibre d'oxydoréduction de la cellule.

Les autres acides dosés correspondent soit à des produits intermédiaires du métabolisme (succinate), soit à un métabolisme secondaire du glycérol utilisant le CO<sub>2</sub> comme accepteur final d'électrons et conduisant à la formation d'acétate.

Hobson et Mann (1961) ont isolé du rumen de brebis des bactéries lipolytiques et des souches de *Slenomonas ruminantium* capables de fermenter le glycérol. L'acide propionique est le produit majeur de conversion du substrat, sa formation mettant en jeu des mécanismes (voies métaboliques, conditions d'induction et de régulation) analogues à ceux décrits pour les bactéries propioniques.

#### ***I.1.3.4.3. Chez les bactéries anaérobies strictes***

##### **✓ Genre *Desulfovibrio***

Certaines bactéries sulfato-réductrices du genre *Desulfovibrio* sont capables de se développer à partir du glycérol comme seule source de carbone en présence ou non de sulfate (Qatibi et coll., 1991). Kremer et Hansen (1987) ont mis en évidence les différentes activités enzymatiques impliquées dans la conversion du glycérol chez deux souches marines: *Desulfovibrio sp* souche 20020, *Desulfovibrio sp* souche 20028 et chez *Desulfovibrio vulgaris*. Ils ont proposé un schéma général d'assimilation de ce substrat chez les bactéries sulfato-réductrices du genre *Desulfovibrio*. Les bactéries sulfato-réductrices transforment le glycérol par l'intermédiaire du G3P en dihydroxyacétone phosphate qui est ensuite convertie par la voie de la glycolyse en acide pyruvique puis en acétate. Les activités enzymatiques glycérol déshydrogénase et NADH déshydrogénase ont été localisées dans la membrane bactérienne. Les électrons libérés au cours de l'oxydation de NADH et du G3P sont utilisés pour la réduction du sulfate, probablement grâce à un système de transport d'électrons lié à la phosphorylation oxydative (Kremer et Hansen, 1987). En absence de sulfate, la production de 1,3-propanediol et de 3-hydroxypropionate à partir du glycérol a été observée chez *Desulfovibrio carbinolicus* (Nanninga et Gottschal, 1986) et chez *Desulfovibrio fructosovorans* (Ollivier et coll., 1988). La présence de sulfate comme accepteur terminal d'électrons diminue la production de 1,3-propanediol. Les équivalents réducteurs libérés au cours de la transformation du substrat en acétate sont utilisés pour la réduction des sulfates en sulfures. (Qatibi et Bories, 1988).

### ✓ Genre *Clostridium*

Les autres micro-organismes anaérobies stricts capables de se développer sur glycérol comme seule source de carbone et d'énergie appartiennent au genre *Clostridium* : *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. butylicum* (Forsberg, 1987). L'analyse des produits de fermentation montre le même profil pour chacun des micro-organismes testés c'est à dire que le 1,3-propanediol est largement majoritaire. Les autres composés observés sont, soit des acides gras volatils comme l'acétate et le butyrate dans le cas de *C. beijerinckii* et *C. butyricum*, soit des solvants dans le cas de *C. butylicum*. Cependant, il a été montré que *C. acetobutylicum* était incapable de produire du 1,3-propanediol à partir du glycérol, le système enzymatique nécessaire à cette voie métabolique étant absent ou n'étant pas induit (Vasconcelos et coll., 1994). La croissance sur glycérol comme seule source de carbone et d'énergie n'est donc pas possible chez ce micro-organisme.

Petitdemange et coll. (1995) ont isolé de nouvelles souches de *C. butyricum* capables de fermenter du glycérol obtenu à partir d'une unité d'estérification d'huile de colza, bien que ce glycérol soit particulièrement toxique, puisque les souches de collection étudiées (DSM 5431 ; ATCC 19398 ; IP 10034 ; IP 3044) sont totalement inhibées. Deux des souches isolées (*C. butyricum* E4 et *C. butyricum* E5) sont aptes à fermenter le glycérol directement issu de l'unité de fabrication (sans prétraitement) avec des caractéristiques fermentaires qui sont comparables à celles obtenues sur glycérol pur. Ces deux souches sont très résistantes à des fortes concentrations de 200 g/L de glycérol et 40 g/L de 1,3-propanediol. La souche *C. butyricum* E5 présente des pourcentages d'inhibition de 66% et 36% respectivement alors que la souche *C. butyricum* DSM 5431 est totalement inhibée. Les fermentations sur glycérol commercial et industriel des souches *C. butyricum* E4 et *C. butyricum* E5 produisent beaucoup plus d'acide butyrique que d'acide acétique en cultures fed-batch que lors des cultures batch. Les meilleurs taux de bioconversion du glycérol en 1,3-propanediol sont obtenus par la souche *C. butyricum* E5 et ceci quelque soit la provenance du glycérol.

Ainsi, le glycérol est uniquement assimilé par des micro-organismes dotés de la voie de réduction de ce substrat, qui utilisent une partie du flux du glycérol vers la synthèse de 1,3-propanediol. Les rendements élevés de conversion du glycérol en 1,3-propanediol (61%) observés chez les Clostridia par Forsberg (1987) indiquent l'importance quantitative de la part de glycérol détournée vers la synthèse de 1,3-propanediol pour assurer l'équilibre d'oxydoréduction. Chez *C. butyricum* 1212t2, ce rendement est de 65% (Heyndrickx et coll., 1991a).



Afin d'améliorer les rendements de conversion du glycérol en 1,3-propanediol, Abbad-Andaloussi et coll. (1995) ont obtenu des mutants en utilisant la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Ces mutants ne dégagent plus d'hydrogène moléculaire. Leur étude a montré que la production en 1,3-propanediol n'a pas augmenté mais que la production du butyrate est accrue par l'apport des éléments réducteurs qui ne sont plus utilisés pour la production de l'hydrogène. Les mutants résistants à l'alcool allylique qui produisent moins de butyrate n'ont pas augmenté leur production en 1,3-propanediol mais les éléments réducteurs qui ne sont pas utilisés pour la production du butyrate sont dégagés sous forme d'H<sub>2</sub> (Abbad-Andaloussi et coll., 1996a).

Seul *C. pasteurianum*, se développant sur glycérol, présente un rendement en 1,3-propanediol faible (6%), la moitié du glycérol étant utilisée pour produire du n-butanol (Heyndrickx et coll., 1991a). Günzel et coll. (1991) ont optimisé des cultures de la souche *C. butyricum* DSM 5431 par un processus fed-batch. Ceci leur a permis d'obtenir un titre final en 1,3-propanediol élevé (58 g/L) et une productivité de 2,3 à 2,9 g/L.h. Saint-Amans et coll. (1994) ont développé un système de culture en fed-batch régulé par le CO<sub>2</sub> dégagé lors de la fermentation du glycérol par *C. butyricum* VPI 3266. Par cette méthode, ils ont pu obtenir un titre final en 1,3-propanediol de 65 g/L. L'intérêt de ce micro-organisme pour la synthèse de 1,3-propanediol n'est donc plus à prouver.

#### ✓ Autres genres

Schink et Stieb (1983) et Stieb et Schink (1984) ont mis en évidence la formation simultanée de 1,3-PPD et de 3-hydroxypropionate par fermentation du glycérol respectivement chez *Pelobacter venetianus* et *Ilyobacter polytropus*. La formation intermédiaire de 3-HPA est alors suggérée de même qu'un mécanisme énergétique impliquant l'intervention de coenzyme A lors de la conversion du 3-HPA en 3-hydroxypropionate. Cette hypothèse mènerait alors à la formation d'une mole d'ATP pour 2 moles de glycérol assimilé.

#### *I.1.3.4.4. Chez les levures et les champignons*

La plupart des levures et champignons répertoriés pour leur capacité à assimiler le glycérol utilisent la voie métabolique du G3P (Hunter et Rose, 1971).

Gancedo et coll (1968) ont établi l'existence d'activités glycérol kinase et G3P déshydrogénase chez *Candida utilis* inductibles par le glycérol.

Chez *Neurospora crassa*, les activités glycérol kinase et G3P déshydrogénase induites par le glycérol ont été mises en évidence par Courtright (1975a, 1975b). Elles sont respectivement localisées dans le cytoplasme et la mitochondrie.

*Saccharomyces cerevisiae*, qui dégrade également le glycérol en DHAP par actions successives d'une glycérol kinase et d'une G3P déshydrogénase (Schatz, 1967), possède un mode de régulation du catabolisme différent des autres espèces. Les enzymes ne sont, en effet, que faiblement induites par la présence de glycérol et sont soumises à une forme de répression catabolique (Sprague et Cronan, 1977). May et Sloan (1981) et May et coll (1982) ont montré que chez *Schizosaccharomyces pombe*, la première étape de conversion du glycérol était une oxydation en DHA, réalisée par une glycérol déshydrogénase à NAD<sup>+</sup> et régulée par répression catabolique. La DHA est ensuite phosphorylée par une kinase présentant une forte spécificité pour la DHA et répressible par le glucose.

## **I.2. LE 1,3-PROPANEDIOL**

### **I.2.1. Propriétés et gisements**

Le 1,3-propanediol ou triméthylèneglycol, est un composé organique de formule semi développée CH<sub>2</sub>OH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>OH et de masse moléculaire 76. C'est un liquide visqueux de densité 1,0597 à 20°C et de température d'ébullition sous 1 atmosphère de 210-212°C. Le 1,3-PPD est miscible à l'eau et aux alcools (Merck Index, 1983).

La production de 1,3-PPD est actuellement assurée par synthèse chimique par hydratation en milieu acide de l'acroléine conduisant au 3-HPA, lequel est ensuite réduit par hydrogénation catalytique en 1,3-PPD. Cette filière présente l'inconvénient d'utiliser un produit très toxique, l'acroléine, et de générer de nombreux composés intermédiaires et secondaires non moins dangereux.

La production industrielle de 1,3-PPD par voie microbiologique n'a pas encore été menée. Pourtant, étant donné le coût de revient élevé de sa synthèse par voie chimique (supérieur à 30F/kg), le bio-procédé paraît intéressant (Deckwer, 1995).

### **I.2.2. Domaines d' utilisation**

Le 1,3-propanediol est utilisé dans la formulation de polyesters tels le polypropylène ou plus particulièrement le polyalkalène téréphtalate. En effet, le 1,3- propanediol augmente, de par sa meilleure réactivité, la longueur des chaînes des polymères comparativement à celles obtenues à partir des monomères conventionnels, le 1,2-éthanediol et le 1,4-butanediol (Elm

et coll., 1980). De plus, le polymère obtenu, le polypropylène téréphtalate (PPT) adopte une structure lui conférant de meilleures propriétés mécaniques de résistance et de réversibilité aux contraintes. Le PPT présente aussi une meilleure élasticité comparativement au polyéthylène téréphtalate (PET) et au polybutylène téréphtalate (PBT), laquelle devient alors comparable à celle des polyamides. L'utilisation de PPT dans les secteurs des tapis et des textiles a pour cela été récemment entreprise au niveau industriel (Degussa, Schell).

D'autre part, l'utilisation du 1,3-PPD dans la synthèse de polyuréthane (PU) présente également un intérêt. Jouant le rôle d'agent extenseur de chaînes, le 1,3-PPD permet une meilleure maîtrise de la vitesse de la réaction et de la longueur de la chaîne lors de la phase de polymérisation, tout en apportant des propriétés physiques et mécaniques appréciables aux polymères finaux tel que: l'élasticité, résistance à la lumière et à la corrosion. Le 1,3-PPD est utilisé également comme additif dans la préparation de produits agro-alimentaires et pharmaceutiques et dans les aliments pour animaux.

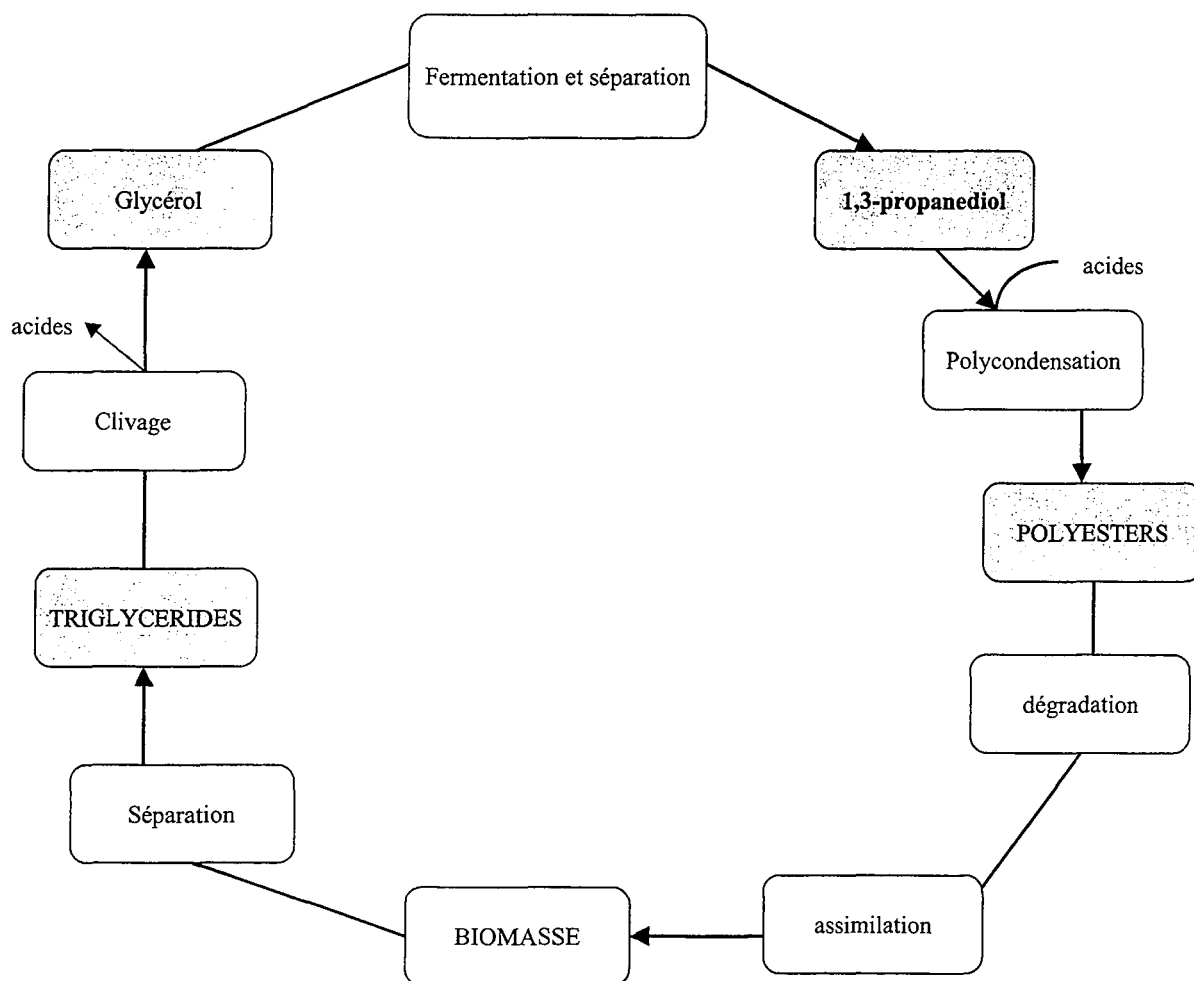
Enfin, parallèlement aux propriétés remarquables apportées par l'usage du 1,3-PPD dans la synthèse de polymères, l'introduction de 1,3-PPD dans ces matériaux leur confère une meilleure biodégradabilité comparativement aux polymères synthétiques (Witt et coll., 1994 ; Deckwer et coll., 1992). Cette biodégradation est peut être due à l'accession, par les micro-organismes, à la structure de base du polyester (Witt et coll., 1994).

Le but final de cette investigation est d'inclure les plastiques dans le cycle naturel ce qui permettra de fermer ce dernier et de réduire la demande d'espace pour déposer, pour longtemps, le plastique gaspillé (**Figure 10**).

Deux effets positifs peuvent donc être obtenus par ce procédé de bioconversion du glycérol en 1,3-propanediol :

- production d'un composé à haute valeur ajouté
- biodégradabilité des polymères dont la structure est basée sur le 1,3-propanediol.

Etant donné les réelles possibilités, sur le plan technique, de substitution du 1,2-éthanediol et du 1,4-butanediol par le 1,3-PPD, un marché important pourrait s'ouvrir à ce composé et représenter de l'ordre de 575 000 tonnes/an (Claude, 1996). Les aspects économiques doivent toutefois être pris en compte. Etant donné les nouvelles propriétés apportées aux matériaux par l'utilisation du 1,3-PPD, de nouveaux usages pour ces produits nouveaux devraient permettre néanmoins de diversifier les marchés.



**Figure 10.** Inclusion des polymères biodégradables dans le cycle naturel (Witt et coll., 1994).

## **I.2.3. Les procédés de production du 1,3-Propanediol**

### **I.2.3.1. Les conditions de culture**

#### ***I.2.3.1.1. Les besoins nutritifs***

La production de 1,3-PPD par voie microbienne nécessite un milieu nutritif comprenant des oligo-éléments et une source azotée ( $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\dots$ ). Ce milieu est généralement supplémenté en extrait de levure apportant de nombreux composants nutritifs et vitaminiques. Cela n'est toutefois pas indispensable car la production de 27 g/L de 1,3-PPD par *C. freundii* a été réalisée sur un milieu entièrement minéral (Gottschalk et Averhoff, 1990).

Parmi les oligo-éléments, la présence de cobalt s'avère primordial pour la synthèse de 1,3-PPD (Tran-Dinh et Hill, 1989 ; Forsberg, 1987). Cette dépendance envers ce cation est vraisemblablement liée à la glycérol déshydratase dont l'activité enzymatique nécessite le  $\text{CoB}_{12}$ , cofacteur possédant un atome de cobalt.

#### ***I.2.3.1.2. Les conditions opératoires***

L'anaérobiose est généralement requise pour écarter l'utilisation de la chaîne respiratoire chez les bactéries anaérobies facultatives et éviter les phénomènes d'inhibition chez les bactéries anaérobies strictes. Toutefois, un procédé d'obtention de 1,3-PPD avec *K. pneumoniae* préconise les conditions d'aération du milieu de culture et une vitesse d'agitation de 300 tours/min (Tran-Dinh et Hill, 1989). L'efficacité du transfert de l'oxygène et la pression partielle en oxygène dissous du milieu de culture ne sont toutefois pas précisées.

Des conditions de neutralité de pH sont préférentiellement utilisées dans le cas de *K. pneumoniae* et *C. freundii* (Homman et coll., 1990 ; Boenigk et coll., 1993 ; Kretschmann et coll., 1990). Tran-Dinh et Hill (1989) se placent par contre à un pH de 5,5 pour réaliser la fermentation avec *K. pneumoniae*. Dans le cas des Clostridia, un pH de 6,5 est optimal pour la production de 1,3-PPD (Forsberg, 1987). La gamme de température généralement utilisée va de 30 à 37°C.

### I.2.3.2. Les procédés et performances fermentaires

#### I.2.3.2.1. Culture discontinue

Les performances, en terme de rendement de conversion et de productivité en 1,3-PPD, de cultures discontinues à partir de divers micro-organismes et en présence initialement de 20 g/L et 50 g/L de glycérol sont mentionnées respectivement dans les **tableaux I et II** :

**Tableau I** : Performances fermentaires de cultures discontinues en présence de 20 g/L de glycérol.

Micro-organisme	Rendement molaire en 1,3-PPD	Productivité (g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Référence
<i>C. freundii</i>	0,64	0,90	Homman et coll., 1990
<i>K. pneumoniae</i>	0,52	1,34	Homman et coll., 1990
<i>K. oxytoca</i>	0,36	0,49	Homman et coll., 1990
<i>C. butyricum</i>	0,62	1,14	Biebl et coll., 1992

Ces données permettent de constater que le rendement de production de 1,3-PPD dépend du microorganisme utilisé. Les valeurs maximales sont obtenues avec *C. freundii* et *C. butyricum*, cette dernière souche présentant la meilleure productivité.

En outre, il apparaît que le rendement de conversion est indépendant de la concentration en glycérol, quelle que soit la bactérie utilisée. Par contre, ce paramètre permet d'augmenter la productivité.

**Tableau II** : Performances fermentaires de cultures discontinues en présence de 50 g/L de glycérol.

Micro-organisme	Rendement molaire en 1,3-PPD	Productivité (g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Référence
<i>C. freundii</i>	0,64	1,35	Homman et coll., 1990
	0,64	1,20	Kretschman et coll., 1990
<i>K. pneumoniae</i>	0,52	1,34	Homman et coll., 1990
	0,53	1,40	Kretschman et coll., 1990
<i>K. oxytoca</i>	0,41	0,68	Homman et coll., 1990
<i>C. butyricum</i>	0,67	1,21	Petitdemange et coll., 1995

### *I.2.3.2.2. Culture en fed-batch*

Les cultures menées en mode fed-batch ont été réalisées pour la plupart avec *C. butyricum* selon diverses stratégies. Ainsi, après avoir sélectionné par mutagenèse une souche de *C. butyricum* pour ses capacités de résistance aux inhibitions par le 1,3-PPD et les acides (Abbad-Andaloussi et coll., 1995 ; 1996a), 122 g/L de glycérol ont été assimilés par ce micro-organisme en 48 heures, produisant 65,6 g/L de 1,3-PPD. Le rendement molaire obtenu est alors de 0,65 et la productivité globale de 1,37 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (Petitdemange et coll., 1995). Des résultats semblables ont été obtenus par Biebl et coll.(1992) avec production de 56,4 g/L de 1,3-PPD à partir de 98,3 g/L de glycérol, soit un rendement molaire de 0,69, avec une productivité de 1,65 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Saint Amans et coll. (1994) ont aussi décrit la synthèse de 65 g/L de 1,3-PPD avec une productivité de 1,21 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> et un taux de conversion de 0,56 mole/mole, grâce à un contrôle de la fermentation basé sur la production de gaz. Enfin, en régulant l'ajout de glycérol et d'ammonium, et en limitant ainsi les processus d'inhibition par les substrats, une meilleure productivité en 1,3-PPD, atteignant 2,4 g/L , a pu être obtenue (Reimann et Biebl, 1996).

Des rendements similaires ont également été obtenus avec *K. pneumoniae* par apport séquentiel du substrat et dans des volumes de culture plus importants (Günzel et coll., 1991).

### *I.2.3.2.3. Culture continue*

Plusieurs études menées en culture en continu limitée par le glycérol ont été réalisées avec divers micro-organismes (**Tableau III**).

**Tableau III** : Performances fermentaires en culture continue.

Micro-organisme	Glycérol apporté (g/L)	Taux de dilution (h <sup>-1</sup> )	Rendement molaire en 1,3-PPD	Référence
<i>K. pneumoniae</i>	15	0,30	0,47	Streekstra et coll., 1987
<i>C. freundii</i>	28	0,30	0,54	Boenigk et coll., 1993
<i>C. butyricum</i>	10	0,04 - 0,30	0,60	Abbad-Andaloussi et coll., 1996b
<i>C. butylicum</i>	19 et 38	0,10	0,61	Forsberg, 1987

Les espèces du genre *Clostridium* présentent les meilleurs rendements de conversion du glycérol en 1,3-PPD. La particularité de ces bactéries est de maintenir constant ce paramètre quel que soit le taux de dilution imposé. Par contre, en augmentant la valeur du taux de croissance des cultures de *K. pneumoniae* et *C. freundii*, on constate une élévation simultanée du taux de conversion en 1,3-PPD.

En changeant la nature de la limitation, des variations notables du rendement en 1,3-PPD sont aussi observées. Ainsi, lors d'une culture en continu de *K. pneumoniae* maintenue à un taux de dilution de  $0,35 \text{ h}^{-1}$  sous limitation par le phosphate, l'azote (ammoniac) ou le sulfate, le taux de conversion molaire du glycérol en 1,3-PPD atteint respectivement 0,68, 0,60 et 0,56.

Il est également possible d'accroître le rendement en 1,3-PPD en se plaçant dans des conditions d'excès de glycérol. Ainsi, maintenue à un taux de dilution de  $0,28 \text{ h}^{-1}$ , une culture de *K. pneumoniae* alimentée avec 61 g/L (662 mM) de glycérol produit du 1,3-PPD selon un taux de conversion molaire de 0,74, la concentration résiduelle en glycérol étant de 28,2 g/L (306 mM) (Zeng et coll., 1993). Dans de telles conditions de culture, il a été supposé que le micro-organisme favorise la voie de production du 1,3-PPD pour minimiser l'accumulation d'éthanol dont l'effet inhibiteur est plus prononcé (Zeng et coll., 1994).

#### ***I.2.3.2.4. Autres stratégies de fermentation***

##### **✓ Utilisation d'un co-substrat**

Deux procédés brevetés consistent en l'utilisation d'un co-substrat énergétique pour améliorer les rendements de conversion du glycérol en 1,3-PPD. Dans ce contexte, la présence de glucose permet aux micro-organismes de maintenir un flux carboné soutenu dans la glycolyse et les voies de production d'énergie, tout en générant un flux important de NADH. Celui-ci est oxydé par distribution préférentielle du glycérol vers la voie de formation du 1,3-PPD.

Le procédé de Tran-Dinh et Hill (1989) consiste en l'incubation pendant 7 heures d'une souche de *K. pneumoniae* en présence de 50 g/L de glycérol. Après ce laps de temps, 50 g/L de glucose sont ajoutés. Le rendement molaire de conversion du glycérol en 1,3-PPD atteint alors 0,67, la productivité étant seulement de  $0,44 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Gottschalk et Averhoff (1990) ont utilisé le glucose en tant que co-substrat sur des cellules en phase stationnaire. En présence initialement de 240 mM de glycérol et 84 mM de



glucose, 110 mM de 1,3-PPD ont été produits après seulement 1 heure d'incubation, conduisant à un rendement de 0,9 mole de 1,3-PPD par mole de glycérol dégradé.

La cofermentation en mode batch, des cultures de *C. butyricum* DSM 5431 présentent une phase de latence dans l'utilisation du glycérol durant les 5 premières heures de culture. Une diminution de l'utilisation simultanée des deux substrats apparaît ensuite quels que soient la source carbonée de la préculture et le rapport molaire des deux substrats carbonés.

D'autre part, la présence de glucose augmente la conversion du glycérol en 1,3-PPD : le rendement passe de 57% pour une culture sur glycérol seul à 92-93% en cofermentation (Abbad-Andaloussi et coll., 1998). Le glucose est utilisé par les cellules pour produire de l'énergie et du NADH alors que le glycérol est surtout utilisé pour la production de 1,3-PPD (Abbad-Andaloussi et coll., 1996b).

En mode continu, *C. butyricum* VPI 3266 a été cultivé sur des mélanges glucose-glycérol avec des rapports molaires glycérol / (glycérol+glucose) variant de 0 à 1. Dans ces conditions, la production de 1,3-PPD augmente alors que les vitesses spécifiques de production de butyrate et de l'acétate diminuent si la concentration de glycérol ajoutée reste inférieure à la concentration de glucose présent. Le flux d'électrons est utilisé par la ferrédoxine réduite qui est réoxydée par l'hydrogénase avec formation de H<sub>2</sub>. La vitesse spécifique de formation de NADH ( $q_{\text{NADH}}$ ) est négative et le rapport CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> est inférieur à 1. Dès que ce rapport atteint 0,5, il y a formation de NADH en excès et diminution de la production de H<sub>2</sub>, la ferrédoxine réduite étant réoxydée par l'activité NADH ferrédoxine oxydoréductase (Saint-Amans et Soucaille, 1995). Dans une culture sur mélange glucose-glycérol comparé à une culture sur glucose seul, la diminution de la production des acides acétique et butyrique s'explique par une forte chute des rapports acétyl-CoA/CoA et butyryl CoA/CoA et une forte augmentation du rapport ATP/ADP (Saint-Amans et coll., 2001).

### ✓ Culture bi-étagée

Un système de cultures continues à deux étages, proposé par Boenigk et coll. (1993), est basé sur le découplage partiel de la croissance cellulaire de *C. freundii* et de la production de 1,3-PPD. Ainsi, en se plaçant dans un premier temps dans des conditions de culture favorables à la croissance : 31°C, D= 0,1 h<sup>-1</sup> et pH 7,2 sous limitation en glycérol, la biomasse active formée passe dans un second fermenteur où les conditions réduisent la croissance bactérienne et favorisent la production de 1,3-PPD : 28°C, D= 0,05 h<sup>-1</sup> et pH 6,6 avec apport de glycérol. Globalement, ce procédé permet d'atteindre un rendement molaire de 0,62 avec une productivité de 1,38 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

#### *I.2.3.2.5. Autres études*

##### ✓ **Etude pilote**

Une étude pilote, réalisée par Günzel et coll. (1991), a consisté dans un premier temps à déterminer les effets de divers paramètres sur le comportement fermentaire de *C. butyricum*. Une température de 35°C, un pH de 7 et un barbotage à l'azote permettent de limiter les formes carboniques et de réduire la consommation de KOH. Deux types de réacteurs ont été testés : une colonne à bulle et un réacteur agité de volumes utiles de 1,2 m<sup>3</sup> et 2 m<sup>3</sup> respectivement. Réalisées en mode fed-batch en présence initialement de 20 ou 50 g/L de glycérol, ces cultures ont permis d'obtenir des concentrations finales en 1,3-PPD de 50 à 58 g/L avec un rendement molaire de l'ordre de 0,66 et une productivité entre 2,3 et 2,9 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> avec chacun des deux réacteurs. Ainsi, le maintien des performances fermentaires à l'échelle pilote et les faibles coûts de production engendrés par le réacteur en colonne à bulle, permettent d'envisager son utilisation à une échelle industrielle sans difficulté particulière.

##### ✓ **Etudes appliquées**

Une première étude appliquée, réalisée par Bories et Claret (1992), porte sur la production de 1,3-PPD par *C. butyricum* à partir de résidus industriels d'origine agricole contenant du glycérol, à savoir des vinasses de distillation d'alcool. Naturellement présent à une teneur de 15,8 g/L, le glycérol a été rapidement transformé lors d'une culture en mode discontinu en 8,4 g/L de 1,3-PPD, soit un taux de conversion de 0,64 mole/mole.

Une deuxième étude porte sur l'utilisation de glycérine brute concentrée issue des industries de transestérification des huiles d'origine végétale (Petitdemange et coll., 1995). Après sélection d'une souche de *C. butyricum*, des cultures en mode discontinu en présence de 53 g/L de glycérol et d'éléments nutritifs ont permis d'atteindre des rendements molaires de conversion en 1,3-PPD de 0,62 avec une vitesse de production de 1,2 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. En réalisant une culture en mode fed-batch, une concentration finale en 1,3-PPD de 58,4 g/L a été obtenue selon un taux de conversion de 0,65 mole/mole et une productivité de 1,2 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

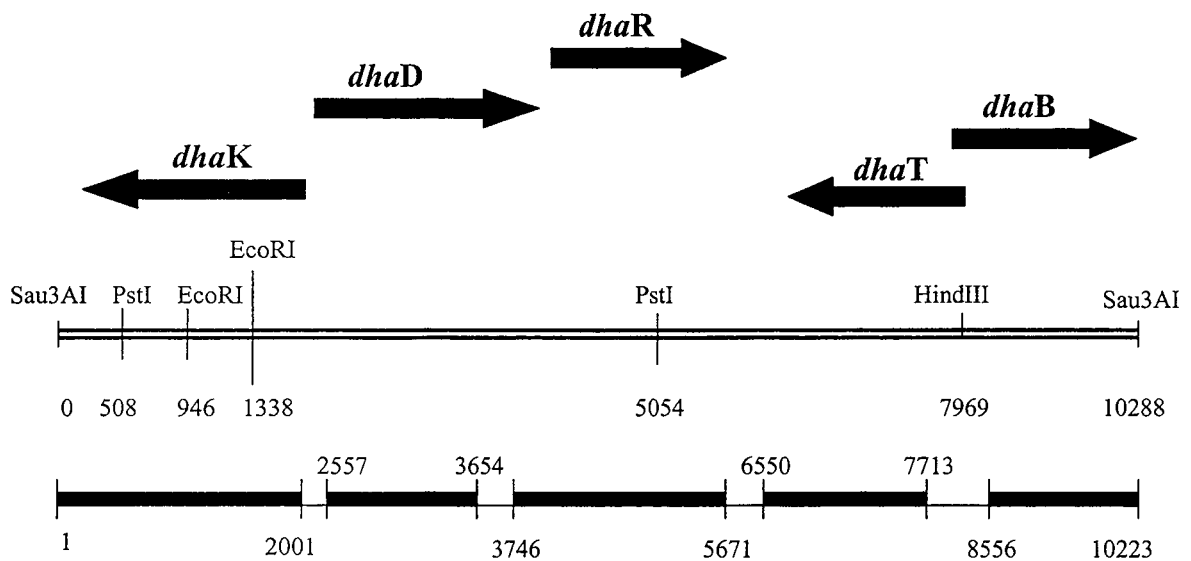
### I.3. LE REGULON *dha*

#### I.3.1. Généralités

Les enzymes clés de la fermentation du glycérol sont la glycérol déshydrogénase et la dihydroxyacétone kinase pour la voie oxydative et la glycérol déshydratase et la 1,3-propanediol déshydrogénase pour la voie réductrice. Ces quatre enzymes sont codées par le régulon *dha*, identifié chez *K. pneumoniae* (Tong et coll., 1991) et *C. freundii* (Daniel et Gottschalk, 1992). L'expression de ce régulon est induite par la DHA ou le glycérol (Forage et Lin, 1982 ; Ruch et coll., 1974).

Chaque enzyme est le produit d'un gène du régulon *dha* : la dihydroxyacétone kinase (produit du gène *dhaK*), la glycérol déshydrogénase (produit du gène *dhaD*), la glycérol déshydratase (produit du gène *dhaB*) et la propanediol déshydrogénase (produit du gène *dhaT*). Le gène *dhaR*, situé en aval du gène *dhaD*, codant pour un polypeptide de 641 acides aminés, joue le rôle de répresseur. Les organismes qui ne possèdent pas le régulon *dha* comme *E. coli*, exigent l'addition d'accepteurs d'électrons exogènes, tels que le fumarate ou le nitrate pour la croissance anaérobie sur glycérol.

Le régulon *dha* de *Citrobacter freundii*, comprenant les quatre enzymes nécessaires pour la fermentation du glycérol, a été cloné chez *E. coli* par Daniel et Gottschalk (1992) (Figure 11).



**Figure 11.** Schéma du régulon *dha* de *Citrobacter freundii* d'après Daniel et coll. (1995b).

### I.3.2. La voie oxydative

#### I.3.2.1. La glycérol déshydrogénase

La glycérol déshydrogénase (glycérol :  $\text{NAD}^+$  oxydoréductase, EC 1.1.1.6) catalyse l'oxydation du glycérol en DHA. Cette enzyme a été partiellement purifi e et caract ris e par Mac Gregor et coll.(1974) chez le genre *Klebsiella*.

#### ✓ Propriétés physiques

La glycérol déshydrogénase se présente sous la forme d'un dimère de masse moléculaire 79 KDa à pH alcalin (pH 8,6) et d'un tétramère de 160 KDa à pH 7 (Ruch et coll., 1980). De nombreuses données cinétiques ont aussi été apport es à partir d'extraits partiellement purifiés. Ainsi l'activité de la glycérol déshydrogénase nécessite la présence d'un cation monovalent et est maximale avec l'ion  $\text{NH}_4^+$ . Celui-ci permet d'augmenter l'affinité de l'enzyme pour le glycérol (Lin et Magasanik, 1960). D'autres cations peuvent se substituer au  $\text{NH}_4^+$  à savoir, dans l'ordre de l'efficacité décroissante,  $\text{Ti}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Rb}^+$  (Mac Gregor et coll., 1974). L'enzyme est par contre affect e par l'ion  $\text{Li}^+$  selon une inhibition non compétitive par rapport au  $\text{K}^+$  avec un  $K_i$  de 40 mM à pH 9,5 (Strickland et Miller, 1968). D'autres cations, tels que le  $\text{Zn}^{2+}$ , ou des chélateurs, tels que le 2,2'-dipyridil, inhibent fortement l'activité enzymatique (Lin et Magasanik, 1960). De plus, elle est relativement thermostable mais très sensible à l'oxygène (Lin et coll., 1960).

#### ✓ Spécificité des substrats

La glycérol déshydrogénase ne présente pas une très grande spécificité de substrat : le 1,2-PPD ( $K_m = 6,1$  mM à pH 9,5), le 1-chloro-2,3-propanediol et le glycérol  $\alpha$ -mono thyl ther sont également oxydés (Lin et Magasanik, 1960). Le  $K_m$  de l'enzyme pour le glycérol est de 450 mM à pH 7,5 en présence de  $\text{NH}_4^+$  et de 13 mM à pH 9,5 en présence de  $\text{K}^+$ . En substituant le  $\text{NH}_4^+$  par l'ion  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_4\text{N}^+$ , le  $K_m$  de l'enzyme pour le glycérol chute de 45 à 2 mM alors que l'affinité pour le  $\text{NAD}^+$  n'est pas modifi e. Malgré cela, la  $V_{max}$  de l'enzyme reste deux fois plus  lev e en présence de  $\text{NH}_4^+$ . Dans le sens non physiologique, le  $K_m$  de l'enzyme pour la DHA est de 0,13 mM à pH 7,7 et une inhibition marqu e par la DHA est observ e dès 0,4 mM (Strickland et Miller, 1968).

### ✓ Mécanismes d'inhibition

Les mécanismes d'inhibition de l'activité glycérol déshydrogénase ont été étudiés par Mac Gregor et coll. (1974). Ainsi, il a été montré que la conversion du  $\text{NAD}^+$  est inhibée de façon compétitive par le NADH, que la DHA est un inhibiteur de type incompétitif vis à vis du  $\text{NAD}^+$  en présence saturante de glycérol, et enfin que le glycérol agit comme un inhibiteur non compétitif par rapport au NADH. Ces observations ont permis d'associer les cinétiques de la glycérol déshydrogénase à un mécanisme Bi Bi ordonné.

### ✓ Inactivation

L'inactivation de la glycérol déshydrogénase est observée par incubation de l'enzyme purifiée en conditions aérobies en présence de  $\text{Fe}^{2+}$  et ascorbate ou de  $\text{Fe}^{2+}$  et dihydroxyfumarate. Il apparaît que l'oxygène et les agents réducteurs forment  $\text{H}_2\text{O}_2$  et que  $\text{H}_2\text{O}_2$  réagit avec  $\text{Fe}^{2+}$  pour générer des espèces actives qui attaquent l'enzyme (Johnson et coll., 1985). La forme inactivée de la glycérol déshydrogénase, obtenue après exposition à l'oxygène, présente les mêmes sous-unités par migration sur gel SDS que la forme active. La forme inactivée présente, d'autre part, une baisse d'affinité pour le  $\text{NAD}^+$ . Les points isoélectriques des formes actives et inactives sont semblables, de l'ordre de 4,7 (Ruch et coll., 1980).

### ✓ Autres origines

La glycérol déshydrogénase a été aussi purifiée chez d'autres micro-organismes :

#### □ *C. freundii*

L'enzyme se présente sous la forme d'un hexamère (sous unités de 43 KDa) et est activée par  $\text{Mn}^{2+}$ . Le  $K_m$  apparent pour le glycérol est de 1,27 mM et de 0,057 mM pour le  $\text{NAD}^+$ . Le gène (*dhaD*) codant pour cette enzyme a été clonée et séquencée chez *E. coli* par Daniel et coll. (1995b). Le polypeptide de 365 acides aminés obtenu montre un grand degré d'homologie avec les glycérol déshydrogénases d'autres micro-organismes (Daniel et coll., 1995b).

#### □ *Bacillus stearothermophilus*

L'enzyme de masse moléculaire 180 KDa est constituée de 4 sous-unités identiques de 42 KDa. L'exposition aux agents chélateurs comme l'EDTA entraîne la perte de l'activité totale. L'enzyme inactivée par l'EDTA est réactivée par le  $\text{Zn}^{2+}$  (Spencer et coll., 1989).

#### □ *Schizosaccharomyces pombe*

L'enzyme est un octamère de masse moléculaire d'environ 400 KDa. Elle est constituée de sous unités identiques de MM= 47 KDa. Le pH optimum pour la réaction d'oxydation du glycérol est de 10 et pour la réaction inverse de 6. Les cations monovalents  $K^+$  et  $NH_4^+$  activent l'enzyme, cependant  $Na^+$  et  $Li^+$  l'inhibent. L'enzyme exige le  $NAD^+$  comme coenzyme qui ne peut pas être remplacé par le  $NADP^+$ . Par contre, l'enzyme peut utiliser le  $NADPH$  dans la réaction inverse. Le  $K_m$  de l'enzyme pour le glycérol est de 0,5 mM et pour le  $NAD^+$  de 0,13 mM. L'enzyme est plus active et plus affine pour le 1,2-PPD que pour le glycérol (Marshall et coll., 1985).

#### □ *E. coli*

L'enzyme existe sous 2 formes actives, une forme mineure et une forme majeure. La forme majeure a une masse moléculaire de 310 KDa et la forme mineure de 81 KDa. L'électrophorèse en conditions dénaturantes donne une seule bande de masse moléculaire de 39 KDa. La glycérol déshydrogénase de *E. coli* apparaît exister comme dimère (forme majeure) et octamère (forme mineure). L'enzyme est activée par  $NH_4^+$ ,  $K^+$  ou  $Rb^+$  et est fortement inhibée par la N-ethylmaléimide 8-hydroxyquinoline, la 1,10-phenanthroline,  $Cu^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (Tang et coll., 1979).

#### □ *Bacillus megaterium*

L'enzyme a un pH optimum de 9 et catalyse la déshydrogénation, en présence de  $NAD^+$ , du glycérol, du 1,2-PPD et faiblement de l'erythritol. Le  $K_m$  du glycérol est de  $1,4 \times 10^{-3}$  M, et celui du  $NAD^+$  de  $3 \times 10^{-4}$  M. Avec l'application de différentes méthodes (electrophorèse et filtration sur gel), la masse moléculaire de l'enzyme native est estimée à 156-160 KDa. La masse moléculaire de la sous-unité enzymatique déterminée par électrophorèse en conditions dénaturantes est de 38 KDa. Ainsi l'enzyme existe sous forme de tétramère (Scharschmidt et coll., 1983).

#### □ *Gluconobacter industrius*

L'enzyme purifiée présente un pH optimal de 7,5 - 8, différent des pH optimaux (5,5-6) déterminés à partir de fractions membranaires ou de cellules entières du fait de la solubilisation de la protéine et de la présence de détergents. La spécificité de la glycérol déshydrogénase vis à vis du substrat est large, puisqu'elle catalyse l'oxydation de nombreux composés polyhydriques: glycérol, méso-érythritol, en utilisant la phénazine méthosulfate ou le dichlorophénolindophénol comme accepteur final d'électrons. Le  $K_m$  apparent pour le glycérol est de 34 mM dans le cas de l'enzyme libre et de 2,3 mM pour l'enzyme des fractions membranaires (Ameyama et coll., 1985).

### I.3.2.2. La dihydroxyacétone kinase

La DHA kinase (EC 2.7.1.29) catalyse la phosphorylation du DHA en DHA-phosphate. Cette enzyme a été purifiée chez *K. pneumoniae* par Johnson et coll. (1984).

#### ✓ Caractéristiques de l'enzyme

Cette enzyme est un dimère de masse moléculaire 95 KDa. Elle présente un  $K_m$  pour la DHA de l'ordre de 4 - 5  $\mu$ M. Cette très forte affinité pour le substrat permet de déplacer continuellement la réaction de déshydrogénation du glycérol, thermodynamiquement défavorable. La DHA kinase présente de plus une grande spécificité : aucune activité catalytique n'est observée avec le glycérol même en présence de 100 mM. L'activité enzymatique est plus élevée en présence de  $Ca^{2+}$ . Cette protéine permettrait à la cellule de ne pas accumuler le G3P, responsable de l'arrêt de croissance (Cozzarelli et coll., 1965). La courbe de saturation par l'ATP révèle deux zones représentatives de deux niveaux d'affinité pour l'ATP donc 2  $K_m$ , l'un de l'ordre de 25-35  $\mu$ M, l'autre d'environ 200-300  $\mu$ M. La DHA kinase n'est pas inhibée par le fructose 1,6-diphosphate, le PEP, le fructose 1-phosphate et le fructose 6-phosphate présents à des concentrations de 5 mM.

#### ✓ Autres origines

La DHA kinase de *Candida boidinii* a été purifiée par Bystrykh et Trotsenko (1983). Cette enzyme est un dimère de masse moléculaire 139 KDa.

La masse moléculaire de la sous-unité enzymatique déterminée par électrophorèse en conditions dénaturantes est de 71 KDa. Le pH optimum de l'enzyme est de 7,8 - 8,2. L'enzyme phosphoryle la DHA et à un faible degré le glycéraldéhyde. L'ATP est le groupement donneur de phosphate le plus efficace. Quand l'ITP, GTP, CTP et UTP sont utilisés, l'activité DHA kinase diminue de 70%.

La DHA kinase de *C. freundii* a été récemment purifiée par Daniel et coll. (1995b). D'une masse moléculaire de 105 KDa, cette protéine est un dimère constitué de deux sous-unités de 57 KDa. Les  $K_m$  apparents de cette enzyme pour le glycérol et l'ATP sont respectivement de 30 et 70  $\mu$ M.

Cette DHA kinase présente également une forte spécificité vis à vis du substrat. Son activité catalytique est plus élevée en présence de  $Mn^{2+}$ . Le gène *dhaK*, codant pour cette enzyme, a été cloné et séquencé chez *E. coli*. Le polypeptide de 552 acides aminés obtenu, ne présente pas de similitude avec les séquences existantes.

### I.3.3. La voie réductrice

#### I.3.3.1. La glycérol déshydratase

Dans la voie de synthèse du 1,3-PPD par fermentation du glycérol, la première étape est la déshydratation de celui-ci en 3-HPA par une glycérol déshydratase coenzyme B<sub>12</sub>-dépendante. La glycérol déshydratase (EC 4.2.1.30) de *K. pneumoniae* a été purifiée jusqu'à homogénéité par Schneider et coll. (1970).

#### ✓ Caractéristiques physiques et cinétiques

Celles-ci ont en partie été déterminées à partir de l'enzyme partiellement purifiée. La glycérol déshydratase est composée de deux sous-unités, l'une A d'une masse moléculaire de 22 KDa, l'autre B de 240 KDa. Le complexe AB forme l'apoenzyme (Schneider et Pawelkiewicz, 1966), la combinaison d'une mole de AB avec deux moles de coenzyme B<sub>12</sub> (CoB<sub>12</sub>) constituant l'holoenzyme (Lee et Abeles, 1963 ; Pawelkiewicz et Zagalak, 1965). L'association entre les deux sous-unités est favorisée par la présence d'un cation monovalent (K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Le glycérol joue un rôle stabilisant vis à vis du complexe AB, suggérant l'existence d'une liaison apoenzyme-glycérol (Connor-Johnson et coll., 1975).

La protéine A est thermostable et présente une stabilité minimale à 70°C. En solution légèrement acide et de faible force ionique, cette protéine se dissocie en sous-unités de 12 KDa, suggérant l'existence d'un équilibre de dissociation/association entre les deux sous-unités dépendant de la concentration en ions H<sup>+</sup>. La protéine A ne contient pas de groupement thiol actif, à la différence de la protéine B. Cette dernière est stable jusqu'à 70°C (Schneider et Pawelkiewicz, 1966). L'holoenzyme est composé de l'apoenzyme et du cofacteur B<sub>12</sub>. Le complexe apoenzyme-CoB<sub>12</sub> nécessite la présence de l'ion K<sup>+</sup> pour être actif, ce cation pouvant être remplacé par Li<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Tl<sup>+</sup> ou Rb<sup>+</sup> (Lee et Abeles, 1963 ; Pawelkiewicz et Zagalak, 1965). Le tampon de réaction définit le caractère allostérique de la réaction enzymatique. Ainsi, en présence de tampon glycine, l'association de l'apoenzyme et du cofacteur B<sub>12</sub> est maximale et la cinétique réactionnelle suggère l'existence d'une coopérativité positive. Par contre, une coopérativité négative est observée lorsque le tampon du milieu de réaction est l'éthanolamine (Stroinski et coll., 1974). Un pH de 8,0 et une température de 37°C sont des conditions permettant une activité enzymatique optimale. D'un point de vue cinétique la conversion du glycérol est une réaction du second ordre (Pawelkiewicz et Zagalak, 1965). L'activité de l'holoenzyme est inhibée par les groupements thiol et cyano/hydroxy-cobalamine.



### ✓ **Spécificité des substrats**

La glycérol déshydratase catalyse la conversion du glycérol, du 1,2-PPD et du 1,2-ethanediol respectivement en 3-HPA, propionaldéhyde et acétaldéhyde (Toraya et Fukui, 1977), le glycérol étant le substrat préférentiel en terme de vitesse de réaction. Les  $K_m$  apparents de ces trois substrats sont respectivement de 1,3 mM, 0,8 mM et 0,6 mM (Poznanskaya et Korsova, 1979). Après sa formation, l'holoenzyme devient rapidement inactive, la forme inactive étant constituée de l'apoenzyme liée au groupement hydroxycobalamine (Poznanskaya et coll., 1977).

### ✓ **Mécanisme de la réaction**

Les réactions catalysées par la glycérol déshydratase procèdent par un mécanisme impliquant le  $\text{CoB}_{12}$  comme cofacteur essentiel. Le  $\text{CoB}_{12}$  contient une seule liaison covalente Co-C, qui est stable en solution aqueuse, mais qui subit facilement un clivage homolytique dans la réaction enzymatique  $\text{CoB}_{12}$ -dépendante. Ce clivage homolytique est la première étape du cycle catalytique ( Abeles et Dolpin, 1976 ; Toraya, 1998).

### ✓ **Le coenzyme $\text{B}_{12}$**

Le  $\text{CoB}_{12}$  est constitué du 5,6-diméthylbenzimidazole ribonucléotide lié à un atome de cobalt contenu dans un plan de coordination. La sixième position de coordination du cobalt comprend le groupement 5'-déoxyadénosyle. Lorsque cette position est occupée par le groupe cyanure ou hydroxyle, il y a formation respectivement de cyano-cobalamine (vitamine  $\text{B}_{12}$ ) ou d'hydroxy-cobalamine (Gottschalk, 1987).

### ✓ **La forme inactive**

La purification du complexe apoenzyme-hydroxycobalamine, forme stable et inactive de l'enzyme, a été réalisée par Schneider et coll. (1970). Sa masse moléculaire est de 188 KDa correspondant à un ratio apoenzyme/hydroxycobalamine de 1. Le passage de la forme inactive à la forme active est possible par remplacement du groupe hydroxycobalamine par le  $\text{CoB}_{12}$  en présence de  $\text{Mg}^{2+}$  et de  $\text{SO}_3^{2-}$ .

Une étude in situ du processus d'inactivation a été menée par Honda et coll. (1980) à partir de cellules perméabilisées par traitement au toluène. L'inactivation de l'holoenzyme est consécutive à la conversion du glycérol en 3-HPA. La forme inactive a alors pu être rapidement et continuellement réactivée par l'ATP et  $\text{Mn}^{2+}$  en présence

d'adénoxcobalamine. L'ATP peut alors être remplacé par le GTP ou le CTP,  $Mn^{2+}$  par  $Mg^{2+}$  et partiellement par  $Co^{2+}$ . Par contre, l'hydroxycobalamine ne permet pas la réactivation de l'enzyme.

### ✓ La diol déshydratase

La présence de glycérol dans le milieu de culture induit également, à un niveau beaucoup plus faible, la diol déshydratase ; cette enzyme est par contre fortement synthétisée en présence de 1,2-PPD (Abeles et Lee, 1961 ; Toraya et coll., 1978 ; 1979 ; Forage et Foster, 1979). La diol déshydratase catalyse la première étape de la voie de dégradation du 1,2-PPD, qui produit le propionaldéhyde (Lee et Abeles, 1963). Ensuite le propionaldéhyde est converti en quantité égale de propanol et d'acide propionique. La fermentation du 1,2-PPD fournit une mole d'ATP par molécule de propanediol mais pas de source de carbone. La dégradation aérobie du 1,2-PPD peut fournir l'énergie et le carbone. La diol déshydratase présente une composition en sous-unités de type  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ . Cette enzyme a été purifiée chez *K. pneumoniae* par Poznanskaya et coll. (1979). De masse moléculaire 230 KDa, cette protéine est constituée de deux composants protéiques différents F et S. La protéine F est un polypeptide de masse moléculaire 26 KDa. La protéine S est constituée de 4 polypeptides de masse moléculaire 60, 23, 15,5, et 14 KDa. La diol déshydratase catalyse la conversion du 1,2-PPD, 1,2-éthanediol, glycérol, 1,2-et 2,3-butanediol en la forme aldéhydique correspondante (Toraya et coll., 1976). Malgré les grandes similitudes que présentent ces deux enzymes, elles se distinguent par leur différence d'affinité pour le  $CoB_{12}$  (Forage et Foster, 1979) et leurs comportements immunochimiques divergents (Toraya et Fukui, 1977).

La diol déshydratase de *Clostridium glycolicum* est extrêmement sensible à l'oxygène et est fortement associée avec la membrane cellulaire. L'enzyme est spécifique pour le 1,2-éthanediol et le 1,2-PPD et exige l'addition d'agents réducteurs pour son activité maximale. L'enzyme est fortement inhibée par de faibles concentrations d'EDTA, d'éthylène glycol bis ( $\beta$ -aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-acide tetracétique, d'ortho-phenanthroline d'hydroxylamine, d'hydroxyurée, et de réactifs sulfhydryles. L'irradiation avec la lumière n'inhibe pas l'activité enzymatique (Hartmanis et Stadtman, 1986).

### ✓ Autres origines

La glycérol déshydratase de *L. reuteri* a été purifiée par Talarico et Dobrogosz (1990). D'une masse moléculaire de 200 KDa, l'analyse électrophorétique en conditions dénaturantes aboutit à une seule sous-unité de 52 KDa. Le  $K_m$  de l'enzyme pour le glycérol est de 3,3 mM en présence de 0,5 mM de CoB<sub>12</sub>. Le  $K_m$  pour le CoB<sub>12</sub> est de 0,3 μM en présence de 200 mM de 1,2-PPD. Son pH optimal est de 7,2.

La glycérol déshydratase de *C. freundii* a été purifiée et caractérisée par Seyfried et coll. (1996). Elle est constituée de 3 sous-unités protéiques  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de masse moléculaire ( $\alpha$ ) 60433, ( $\beta$ ) 21487 et ( $\gamma$ ) 16121 Da. Elles sont codées respectivement par les gènes *dhaB*, *dhaC* et *dhaE*. Le gène *dhaB* code pour un polypeptide de 555 acides aminés, il est suivi par les gènes *dhaC* et *dhaE*, qui codent pour des polypeptides de 194 et 142 acides aminés respectivement. La masse moléculaire de l'enzyme native déterminée par électrophorèse native est de 190 KDa.

La glycérol déshydratase de *Cl. pasteurianum* a été récemment purifiée par Macis et coll. (1998). L'enzyme a une masse moléculaire de 190 KDa, elle convertit le glycérol, le 1,2-PPD et le 1,2-ethanediol en 3-HPA, propionaldéhyde et acétaldéhyde respectivement, mais le glycérol est son substrat préféré. Elle présente une composition en sous-unités de type  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ . Les gènes codant pour la glycérol déshydratase de *Cl. pasteurianum* ont été clonés et exprimés chez *E. coli*. Quatre gènes potentiels sont identifiés au sein de la séquence de la glycérol déshydratase désignés par *dhaB*, *dhaC*, *dhaE* et *orfZ*. Les gènes *dhaBCE* codent pour les 3 sous-unités de la glycérol déshydratase  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Le gène *dhaB* (1665 pb) code pour un polypeptide de 554 AA avec une masse moléculaire de 60813 Da. Il est suivi par les gènes *dhaC* (540 pb) et *dhaE* (441 pb) codant pour des polypeptides de MM de 19549 et 16722 Da, respectivement. Les gènes *dhaBCE* chez *Cl. pasteurianum* sont à 70,8% identiques aux gènes *dhaBCE* de *C. freundii*, à 71,2% identiques à *GldABC* de *K. pneumoniae*, à 66,4% identiques à *PddABC* de *K. oxytoca* et à 66,4% identiques à *PduCDE* de *S. typhimurium*. Il a été montré que pour les glycérol déshydratases de *Cl. pasteurianum*, *C. freundii*, *K. pneumoniae* et *K. oxytoca*, le produit du gène *orf Z* ne code pas pour une sous-unité nécessaire à l'activité glycérol déshydratase. Les travaux de Skraly et coll. (1998) révèlent que la synthèse de 1,3-PPD est plus efficace en présence de *orf Z*.

### I.3.3.2. La 1,3-propanediol déshydrogénase

La 1,3-PPD déshydrogénase (EC 1.1.1.202) catalyse la réaction de réduction du 3-HPA issu de la déshydratation du glycérol via la voie réductrice en un produit final, le 1,3-PPD.

Cette enzyme a été purifiée pour la première fois par Johnson et Lin (1987) à partir de *K. pneumoniae*. Depuis, cette enzyme a été purifiée à partir de *L. buchneri* et *L. brevis* (Veigada-Cunha et Foster, 1992), *L. reuteri* (Talarico et coll., 1990), *C. freundii* (Daniel et coll., 1995a) et *E. agglomerans* (Barbarito et coll., 1997a). Les caractéristiques de cette enzyme sont résumées dans le **tableau IV**.

**Tableau IV:** Caractéristiques de la 1,3-PPD déshydrogénase de divers micro-organismes

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. freundii</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>E. agglomerans</i>
MM (Da) et nombre de sous-unités	328000 6/8 x 45000	331000 8 x 43400	355000 42/46000	355000 42000	180000 4x41000	355000 8/10 x 38500
$K_m$ 3-HPA	n.d	0,14 mM	n.d	n.d	7,8 mM	0,56 mM
$K_m$ NADH	n.d	0,033 mM	n.d	n.d	0,030 mM	0,032 mM
$K_m$ 1,3-PPD	18 mM	1,25 mM	14 mM	2 mM	n.d	14 mM
$K_m$ NAD <sup>+</sup>	0,31 mM	0,3 mM	0,37 mM	0,067 mM	n.d	0,24 mM
Substrats sens physiologique	propionaldéhyde	propionaldéhyde glycéraldéhyde acétaldéhyde acroléine	propionaldéhyde butyraldéhyde glycéraldéhyde acétaldéhyde	propionaldéhyde butyraldéhyde glycéraldéhyde acétaldéhyde	DHA acétol acétone	propionaldéhyde glycéraldéhyde DHA acétol acétaldéhyde acroléin
Substrats sens non physiologique	n-propanol	1,4-butanediol n-butanol n-propanol 2-butanol ethanol	1,4-butanediol n-butanol	1,4-butanediol n-butanol n-propanol	glycérol 1,2-PPD	1,2-PPD 2,3-butanediol glycérol éthylène glycol ethanol 2-propanol butanol
affinité métaux	Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	n.d

(n.d: non déterminé).

La masse moléculaire de la 1,3-PPD déshydrogénase de ces souches est de l'ordre de 340 KDa, mis à part pour *L. reuteri* (180 KDa). Les sous-unités ont toutes une masse moléculaire d'environ 43 KDa. Le  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  constituent deux activateurs communs de ces enzymes, sauf pour *L. reuteri* activée par  $\text{K}^+$ .

Dans le sens physiologique, la 1,3-PPD déshydrogénase de *K. pneumoniae* est très spécifique alors que cette discrimination pour le substrat est moins marquée chez les autres souches. Dans le sens oxydatif, les substrats tel que le n-propanol, n-butanol et 1,4-butanediol sont généralement convertis en l'aldéhyde correspondant.

Le  $K_m$  pour le substrat physiologique, le 3-HPA, n'a pas été systématiquement déterminé à cause de sa non-commercialisation. Il est de 7,8 mM et 0,14 mM respectivement pour *L. reuteri* et *C. freundii*. Le  $K_m$  pour le NADH, semblable dans les deux cas, est de 0,03 mM. Les  $K_m$  apparents pour le 1,3-PPD et le  $\text{NAD}^+$  se situent dans une gamme allant de 1,25 à 18 mM et de 0,076 à 0,37 mM respectivement. Le pH optimal de la réaction de réduction, déterminé uniquement dans le cas de *L. reuteri*, est de 6,2.

En conditions aérobies, cette protéine, ainsi que les autres oxydoréductases fonctionnant normalement en absence d'oxygène, sont inactives (Johnson et coll., 1985).

La 1,3-PPD déshydrogénase de *E. agglomerans* est inhibée par le 1,3-PPD avec un  $K_i$  de 13,7 mM. Cette inhibition se traduit par une baisse de 50% de l'activité en présence de seulement 70 mM de 1,3-PPD. Cette enzyme est également inhibée de façon compétitive par le  $\text{NAD}^+$  vis à vis du NADH avec un  $K_i$  de 0,29 mM, c'est à dire neuf fois le  $K_m$  de l'enzyme pour le NADH. Le pH exerce une influence marquée sur l'activité de l'enzyme lorsqu'il se situe entre 7 et 9. L'activité maximale est obtenue à pH 7,8.

La 1,3-PPD déshydrogénase est davantage affectée, pour une même variation de pH, lorsqu'on se situe à pH acide.

Récemment le gène codant pour la 1,3-PPD déshydrogénase de *Cl. pasteurianum* a été cloné et exprimé chez *E. coli* et la séquence du gène *dhaT* (1158 pb) a été déterminée. L'enzyme est un décamère d'un polypeptide de 43,4 KDa, la masse moléculaire de l'enzyme native étant de 440 KDa. Le produit du gène *dhaT* (41776 Da) révèle une analogie élevée avec *dhaT* de *C. freundii* (80,5% d'identité ; 89,8% de similarité). (Luers et coll., 1997).

## I.4. REGULATION DU METABOLISME DES GLUCIDES ET DU GLYCEROL

### I.4.1. Régulation enzymatique

#### I.4.1.1. Le régulon *dha*

La glycérol déshydrogénase, DHA kinase, glycérol déshydratase et 1,3-PPD déshydrogénase, appartenant au régulon *dha*, sont soumises, en plus des régulations au niveau génomique décrites auparavant, à d'autres modes de régulation liées aux conditions opératoires :

#### (1) Passage de l'anaérobiose à l'aérobiose

Cette modification influence les activités des enzymes du régulon *dha*

- ❑ La glycérol déshydrogénase est contrôlée par une régulation post transcriptionnelle consistant en son inactivation lors du passage de conditions de culture anaérobies à l'aérobiose. Initialement associée à un mécanisme énergétique (Lin et coll., 1960) puis à une dénaturation de la protéine (Ruch et coll., 1980), cette inactivation fut ensuite attribuée à un processus consistant en la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par des protéines synthétisées consécutivement à l'exposition à l'oxygène (Chevalier et coll., 1990), suivie de l'inhibition de la glycérol déshydrogénase par réaction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec le Fe<sup>2+</sup> contenu dans l'enzyme (Johnson et coll., 1985). La conséquence est une rapide diminution de la synthèse de DHA, ce qui permettrait indirectement de réduire puis d'annuler l'effet inducteur de cet intermédiaire sur le régulon *dha* (Ruch et coll., 1974). L'ensemble de ces mécanismes régulateurs a également été observé chez *E. coli* après transfert par conjugaison, via un plasmide, des gènes du régulon *dha* appartenant à *K. pneumoniae* (Sprenger et coll., 1989).
- ❑ La 1,3-PPD déshydrogénase est également inactivée par l'oxygène (Johnson et coll., 1985). Cette inactivation impliquerait la présence de radicaux oxygène et serait accélérée par l'acide ascorbique (Johnson et Lin, 1987).
- ❑ La glycérol déshydratase est également inactivée en présence d'oxygène (Connor Johnson et coll., 1975).

## (2) Effet de la température

Daniel et Gottschalk (1992) ont cloné le régulon *dha* de *K. pneumoniae* dans *E. coli*. Une forte expression de la glycérol déshydratase a pu être mise en évidence à 28°C, contrairement au faible niveau obtenu à 37°C. Cet effet n'a toutefois pas été observé vis à vis de l'expression des autres enzymes du régulon.

## (3) Effet du taux de dilution

- A fort taux de dilution, chez *K. pneumoniae* (Streekstra et coll., 1987) et *C. freundii* (Boenigk et coll., 1993) cultivées en culture continue, la part des équivalents réducteurs régénérés par l'activité de la voie du 1,3-PPD augmente considérablement parallèlement à une chute notable de l'activité in vivo de la voie de l'éthanol.
- A faible taux de dilution, une faible activité de la voie du 1,3-PPD est observée et a pu être corrélée à un faible niveau d'activité in vitro de la glycérol déshydratase (Boenigk et coll., 1993). Cela laisse supposer que cette enzyme constitue l'étape limitante de la voie de formation du 1,3-PPD.

La régulation du flux de carbone dans la voie de synthèse du 1,3-PPD semble donc impliquer à la fois le niveau d'expression de la glycérol déshydratase, les activités des voies parallèles de régénération des équivalents réducteurs et la vitesse d'entrée du glycérol.

### I.4.1.2. La voie glycolytique

La voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), empruntée dans le sens glycolytique, est la voie d'oxydation des hexoses en pyruvate. Elle permet la régénération de l'ATP par phosphorylation de substrat, de NADH, ainsi que de nombreux intermédiaires métaboliques requis pour les biosynthèses.

Après son entrée dans la cellule, le glycérol est converti en DHAP et rentre ainsi dans la voie de EMP. En équilibre avec le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) par la triose-phosphate isomérase, ces deux triose-phosphates sont condensés pour former du fructose 1,6-diphosphate. Cet intermédiaire peut alors, via la voie de EMP, conduire au glucose-6-phosphate (néoglucogénèse) avant de rentrer dans la voie des pentoses générant de nombreux métabolites et du NADPH nécessaires à la biosynthèse de nucléotides. La part de carbone métabolisé dans cette voie est généralement faible en anaérobiose (Gottschalk, 1987).

Les enzymes de la voie de EMP sont toutes réversibles sauf trois d'entre elles: l'hexokinase (EC 2.7.1.1), la phosphofructokinase (EC 2.7.1.1.1) et la pyruvate kinase (EC

2.7.1.40). La phosphofructokinase, la pyruvate kinase et la GAP déshydrogénase (EC 1.2.1.12) sont très impliquées dans la régulation de la voie de EMP, puisque leur activité est généralement sensible à de nombreux facteurs. La phosphofructokinase est en plus inhibée par un excès de PEP ou d'ATP, activée par l'AMP et l'ADP (Sanwal, 1970; Gottschalk, 1987). La GAP déshydrogénase catalyse la conversion du GAP en 1,3-diphosphoglycérate avec consommation d'un  $\text{NAD}^+$ . Le composé obtenu, est aussitôt converti en 3-phosphoglycérate par la 3-phosphoglycérate kinase permettant ainsi la synthèse d'ATP par phosphorylation du substrat. La GAP déshydrogénase est généralement inhibée par le NADH et peut ainsi constituer, selon le degré de réduction du substrat, l'étape limitante de la glycolyse. C'est le cas chez *C. acetobutylicum* cultivée en présence d'un mélange de glycérol et de glucose (Girbal et Soucaille, 1994). La pyruvate kinase convertit le phosphoénolpyruvate (PEP), en pyruvate avec transfert du groupement phosphoryle vers l'ADP en formant l'ATP. Cette enzyme est en général activée par le fructose 1,6-diphosphate et par l'AMP (Maeba et Sanwal, 1968 ; Wieker et Hess, 1971). L'AMP exerce un contrôle positif sur l'activité de la pyruvate kinase, ce qui permet de rétablir l'équilibre énergétique de la cellule en stimulant la vitesse de synthèse d'ATP (Sanwal, 1970). Un excès d'ATP, par contre, inhibe cette réaction. Les enzymes de la voie de EMP sont naturellement constitutives (Fraenkel et Vinopal, 1973), les niveaux d'activité pouvant être toutefois soumis à des variations significatives (Hommes, 1966).

#### **I.4.1.3. La décarboxylation oxydative du pyruvate**

Trois principaux systèmes enzymatiques catalysent la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA : le complexe multienzymatique pyruvate déshydrogénase, la pyruvate oxydoréductase et la pyruvate formiate-lyase.

##### **✓ Le complexe pyruvate déshydrogénase**

Le complexe multienzymatique pyruvate déshydrogénase (CPD) est constitué de trois enzymes, la pyruvate déshydrogénase (PDH) (EC 1.2.4.1), la dihydrolipoate transacétylase (E2) (EC 2.3.1.12) et une flavoprotéine: la dihydrolipoate déshydrogénase (E3) (EC 1.6.4.3) agissant séquentiellement dans cet ordre (Hayakaiwa et Koike, 1967). La PDH contient de la thiamine pyrophosphate (TPP). La réaction nécessite globalement le coenzyme A (CoA) et le  $\text{NAD}^+$ .

L'activité de ce complexe multienzymatique est régulée par plusieurs effecteurs agissant spécifiquement au niveau d'une des enzymes du complexe.



La PDH de *E. coli* est stimulée par le PEP et est rétroinhibée compétitivement vis à vis du pyruvate par l'acétyl-CoA (Schwartz et coll., 1968). E3 est soumise à une inhibition par le NADH de type compétitif et son activité est également diminuée par l'acétyl-CoA mais dans des proportions moindres (Hansen et Henning, 1966).

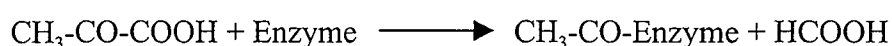
L'activité PDH est généralement observée en aérobiose et son induction a longtemps été associée à la présence d'oxygène (Reed, 1974; Clark, 1989). Pourtant, de récents travaux avec *Streptococcus mutans* (Carlsson et coll., 1985) ont montré la présence de cette enzyme, induite par le pyruvate, en anaérobiose. L'acétyl-phosphate constitue alors un puissant inhibiteur. D'autre part, la synthèse du CPD a également été signalée chez *Enterococcus faecalis* en anaérobiose. Son activité in vivo, à pH acide, est alors prépondérante, voire exclusive, vis à vis de l'activité pyruvate formiate-lyase (Snoep et coll., 1990). Le CPD induit en anaérobiose est également composé de 3 enzymes et est inhibée par le NADH au niveau de E3 (Snoep et coll., 1992).

#### ✓ La pyruvate oxydo-réductase

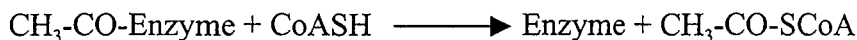
La pyruvate oxydo-réductase (EC 1.2.7.1), particulièrement sensible à l'oxygène, est très répandue chez les bactéries anaérobies strictes, en particulier chez les Clostridia (Kerscher et Oesterhelt, 1981; 1982). Cette enzyme requiert la présence de TPP et de CoA mais non de lipoate (Carlsson et Kujala, 1985). Elle fonctionne avec la ferrédoxine comme accepteur d'électrons et non le NAD<sup>+</sup>. Cette enzyme agit souvent dans le sens de la synthèse de pyruvate à partir d'acétyl-CoA et de CO<sub>2</sub> (Thauer et coll., 1977).

#### ✓ La pyruvate formiate-lyase

La pyruvate formiate-lyase (PFL) (EC 2.3.1.54) catalyse simultanément la décarboxylation oxydative du pyruvate et la réduction du CO<sub>2</sub> en formiate en anaérobiose stricte chez les entérobactéries (Knappe et coll., 1969) et chez des souches des genres *Clostridium* et *Streptococcus* (Thauer et coll., 1972). La réaction se déroule en 2 étapes: la première consiste en la formation d'un complexe enzyme-groupement acétyl et la libération de formiate soit:



la seconde consiste en le transfert du CoA avec régénération de l'enzyme soit:



Cette enzyme se présente sous deux formes en interconversion : une forme active et une forme inactive (Knappe et coll., 1984 ; Knappe et Sawers, 1990). La forme active contient un radical libre organique sensible à l'oxygène, identifié à un radical glycyI en position 734 sur la chaîne polypeptidique par Wagner et coll. (1992). Ce radical, intervenant dans le mécanisme catalytique de clivage de la liaison C-C du pyruvate, est généré par l'action de la PFL fer-dépendante par l'intermédiaire de la fonction adénosyle de la S-adénosylméthionine en présence de la flavodoxine réduite (Knappe et coll., 1974 ; Frey et coll., 1994). La forme inactive consiste en l'enzyme sans radical libre. Ce cycle d'interconversion post-transcriptionnel contrôle l'activité de la PFL dans la cellule.

Du fait de la présence du radical libre, l'activité de cette enzyme est entièrement supprimée en présence d'oxygène (Abbe et coll., 1982). D'autre part, la PFL de *Streptococcus mutans* est inhibée par le GAP et le DHAP, l'effet étant fonction de la concentration en enzyme (Takahashi et coll., 1982). Enfin, le pyruvate agit en tant qu'effecteur allostérique positif (Knappe et Sawers, 1990). L'activité de la PFL est donc contrôlée à la fois par l'oxygène et l'état métabolique de la cellule.

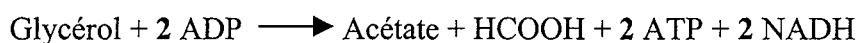
Au niveau de l'expression de la PFL, le pyruvate ou l'un des intermédiaires métaboliques joue le rôle d'inducteur (Sawers et Böck, 1988). L'expression du gène codant pour la PFL, est, d'autre part, partiellement réprimée par le nitrate.

Souvent couplée à la PFL, la formiate hydrogène-lyase (FHL) permet la décomposition du formiate en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> chez de nombreuses entérobactéries (De Vos et coll., 1983). La FHL résulte de l'activité de deux enzymes, une formiate déshydrogénase et une hydrogénase lorsqu'aucun accepteur d'électrons n'est disponible. Par contre, en présence de nitrate ou de fumarate, l'activité formiate hydrogène-lyase résulte de l'action d'une formiate déshydrogénase, différente de la précédente, suivie respectivement de l'activité nitrate réductase ou fumarate réductase. La production d'H<sub>2</sub> n'a pas lieu dans ce cas là (Gottschalk, 1987). La FHL est induite en anaérobiose par son substrat, le formiate, et par l'acidité du milieu (Zinoni et coll., 1984 ; Birkmann et coll., 1987). Contrairement à *K. pneumoniae*, *E. agglomerans* ne décompose pas le formiate en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> (De Vos et coll., 1983) et produit du gaz dans des proportions très faibles (Ewing et Fife, 1972).

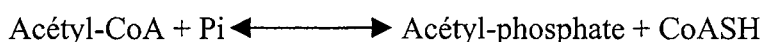
#### I.4.1.4. Les voies acidogènes

##### ✓ La synthèse d'acétate

La synthèse d'acétate à partir de l'acétyl-CoA fait intervenir deux enzymes réversibles : la phosphotransacétylase (EC 2.3.1.8) et l'acétate kinase (EC 2.7.2.1). La présence de ces deux enzymes a été suggérée chez toutes les bactéries anaérobies qui utilisent l'acétyl-CoA pour synthétiser de l'ATP par phosphorylation de substrat (Thauer et coll., 1977). La voie de formation de l'acétate à partir de glycérol chez *K. pneumoniae* est la plus énergétique, car elle génère 2 moles d'ATP par mole d'acétate produit (Streekstra et coll., 1987) :



La phosphotransacétylase catalyse la transformation de l'acétyl-CoA en acétyl-phosphate, générant ainsi un intermédiaire énergétiquement riche tout en libérant le CoA (Brown et coll., 1977) selon la réaction :



Purifiée à partir de *Clostridium thermoaceticum*, cette enzyme est constituée de quatre sous-unités identiques de masse molaire 20 KDa. Son pH optimal est de 7,6 et son activité est significativement stimulée par  $\text{Mn}^{2+}$  (Drake et coll., 1981).

L'acétate kinase réalise l'hydrolyse de l'acétyl-phosphate génère l'acétate avec phosphorylation simultanée de l'ADP en ATP (Rose et coll., 1954 ; Fox et Rosemann, 1986) selon la réaction :



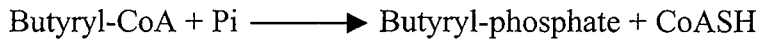
Les propriétés de cette enzyme ont été examinées chez quelques micro-organismes : *Desulfovibrio desulfuricans*, *E. coli* (Thauer et coll., 1977), *C. thermoaceticum* (Schaupp et Ljungdahl, 1974) et *Acetobacterium woodii* (Eden et Fuchs, 1983). Chez *C. thermoaceticum*, l'enzyme a une masse molaire de 60 KDa et son  $K_m$  apparent pour l'acétate est de 135 mM. L'activité de cette enzyme varie avec la quantité d'ATP (Schaupp et Ljungdahl, 1974). L'acétate kinase de *A. woodii* possède un  $K_m$  apparent relativement faible pour l'acétyl-phosphate (0,5 mM) et l'ADP (0,25 mM). Martin et coll. (1983) ont montré que la synthèse de l'acétate kinase est régulée par la concentration en acétate chez *C. acetobutylicum*.

Girbal (1994) a montré que l'addition de pyruvate à une culture continue sur mélange glucose-glycérol entraîne une augmentation des activités phosphotransacétylase et acétate kinase. L'expression de ces deux enzymes est indépendante de la présence d'oxygène (Clark, 1989) avec toutefois des variations de niveaux d'induction en fonction des conditions environnementales (Brown et coll., 1977).

### ✓ La synthèse de butyrate

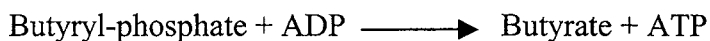
La formation du butyrate requiert la présence d'une phosphotransbutyrylase et d'une butyrate kinase.

La phosphotransbutyrylase (butyryl-CoA : orthophosphate butyryltransférase, EC 2.3.1.19) catalyse la réaction suivante :



Cette enzyme a été mise en évidence pour la première fois chez *C. acetobutylicum* (Gavard et coll., 1957). Elle a ensuite été partiellement purifiée chez *C. butyricum* (Valentine et Wolfe, 1960). Plus récemment, Wiesenborn et coll. (1989) ont purifié et étudié cette enzyme chez *C. acetobutylicum* et *C. beijerinckii*. Chez *C. acetobutylicum*, elle possède une masse molaire de 264 KDa et est constituée de 8 sous-unités. L'activité de ces enzymes dans le sens de formation du butyryl-phosphate (sens physiologique) est très sensible au pH, devenant nulle pour des valeurs inférieures à 6,0. Les valeurs de  $K_m$  pour le butyryl-CoA et le phosphate sont respectivement de 0,11 et 14 mM. Le butyryl-CoA et le butyryl-phosphate sont des inhibiteurs relativement importants de leur propre voie de synthèse. De plus, 10 mM d'ATP entraînent une inhibition de l'activité phosphotransbutyrylase de 53%.

La butyrate kinase (ATP : butyrate phosphotransférase, EC 2.7.2.7) catalyse la réaction suivante :

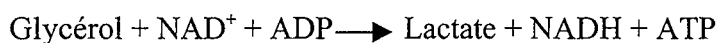


Cette enzyme a été partiellement purifiée chez *C. butyricum* (Twarog et Wolfe, 1962), elle possède un pH optimal de 7,2 et nécessite la présence de cations divalents  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$  pour son activité. Les valeurs de  $K_m$  pour le butyrate, et l'ATP sont respectivement de 20 et 1,4 mM. Plus récemment, la butyrate kinase de *C. acetobutylicum* a été purifiée et caractérisée (Hartmanis, 1987). Sa masse molaire est de 85 KDa, elle semble être constituée de deux sous-unités identiques. Le pH optimal de la réaction de formation du butyryl-phosphate est de 7,5, la valeur de  $K_m$  pour le butyrate est de 14 mM.

Girbal (1994) montre que l'addition de pyruvate à une culture continue sur mélange glucose-glycérol entraîne une augmentation des activités phosphotransbutyrylase et butyrate kinase d'un facteur 4 et 6 respectivement. De plus une relation linéaire est trouvée entre les deux activités et la concentration intracellulaire en ATP, une augmentation de cette dernière entraînant une diminution des activités enzymatiques.

### ✓ La synthèse de lactate

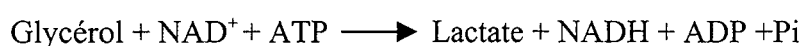
La synthèse du D-lactate à partir du pyruvate se produit en une seule étape par l'intermédiaire de la D-lactate déshydrogénase (EC 1.1.2.3), protéine cytoplasmique liée au NAD<sup>+</sup> (Tarmy et Kaplan, 1965 ; 1968). Cette enzyme permet la conversion du pyruvate en lactate avec génération de 1 mole de NAD<sup>+</sup>. A partir du glycérol, cette voie, productrice d'ATP, ne présente pas un bilan d'oxydo-réduction équilibré :



Cette enzyme est présente à la fois en aérobiose et en anaérobiose. La lactate déshydrogénase est régulée de façon allostérique par le pyruvate (Tarmy et Kaplan, 1968). La synthèse de lactate est pour cela observée dans des conditions de culture générant une accumulation de pyruvate. La lactate déshydrogénase est également régulée par le fructose 1,6-diphosphate chez de nombreux micro-organismes des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Bifidobacterium* (Wittenberg et Angelo, 1970 ; Wolin, 1964 ; Vries et Stouthamer, 1968 ; Gottschalk, 1987). Cet effecteur agirait en diminuant le K<sub>m</sub> apparent de l'enzyme vis à vis du pyruvate et du NADH (Wittenberg et Angelo, 1970). D'autre part, Yamada et Carlsson (1975) ont montré que la lactate déshydrogénase de *S. mutans* est inhibée par le PEP, ADP, AMP et le phosphate inorganique.

La présence de la L-lactate déshydrogénase en anaérobiose a été montrée chez *Cl. acetobutylicum* (Freier et Gottschalk, 1987). L'activité de cette enzyme est également activée par le fructose 1,6-diphosphate en présence des ions calcium et magnésium.

La synthèse de lactate peut également se produire via le shunt du méthylglyoxal (Cooper et Anderson, 1970 ; Steerkstra et coll., 1987). Cette voie métabolique, parallèle à la voie de EMP, est initiée au niveau de la DHAP par sa conversion apparemment irréversible (Hopper et Cooper, 1971) en méthylglyoxal couplée à la libération de l'orthophosphate inorganique (Cooper, 1984). Le méthylglyoxal ainsi formé est transformé en D-lactate par le système glyoxalase (Racker, 1951) comprenant la glyoxalase I et la glyoxalase II (Cooper, 1984). Le bilan de cette voie de formation du lactate à partir du glycérol est alors :

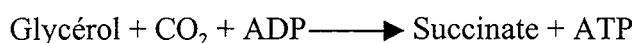


Malgré son bilan énergétique déficitaire, cette voie métabolique est très répandue chez les entérobactéries et a également été observée chez le genre *Clostridium* (Cooper, 1975).

Couplé à la conversion du D-lactate en pyruvate par la lactate oxydase associée à une flavine, le shunt du méthylglyoxal a pour rôle physiologique de rendre possible la formation d'acétyl-CoA à partir de DHAP dans des conditions de faibles concentrations en phosphate responsables d'une limitation de l'activité GAP déshydrogénase (Gottschalk, 1987). Ces conditions évitent, par la même, l'accumulation toxique des trioses-phosphates (Cozzarelli et coll., 1965). L'utilisation de la voie du méthylglyoxal a également été montrée dans le cas d'une culture continue de *K. pneumoniae* en anaérobiose sur glucose : à faibles taux de dilution, "un pulse" de glucose se traduit exclusivement par la synthèse de lactate alors qu'à forts taux de dilution, une augmentation du taux de croissance est observée (Teixeira de Mattos et Tempest, 1983). Les activités de la voie du méthylglyoxal et des voies cataboliques sont alors maximales à faibles taux de dilution à la différence de celles des fonctions anaboliques et inversement à forts taux de dilution. Un tel découplage entre les activités cataboliques et anaboliques permet de supposer que le rôle du shunt du méthylglyoxal est alors d'éliminer l'excès de substrat quand l'activité anabolique est minimale (Teixeira de Mattos et coll., 1984).

#### ✓ La synthèse du succinate

La synthèse du succinate est généralement faible chez *E. coli* (Clarck, 1989) et sa fonction est plutôt d'ordre anabolique que catabolique car le succinate est un précurseur de la synthèse de tétrapyrroles (Thauer et coll., 1977). Elle implique une étape de carboxylation du PEP suivie de deux réactions de réduction associées au NADH. La PEP carboxylase permet, dans un premier temps, de former l'oxaloacétate. Cet intermédiaire est ensuite successivement converti en malate par la malate déshydrogénase, fumarate par la fumarase et enfin succinate par la succinate déshydrogénase. La conversion du glycérol en succinate est donc équilibrée du point de vue du bilan d'oxydo-réduction et de plus énergétique de par la production d'ATP :



La réduction du fumarate en succinate par la fumarase, l'ultime étape de la voie de synthèse, a été étudiée chez *E. coli* en relation avec la fonction d'accepteur d'électrons du fumarate en anaérobiose (Haddock et Jones, 1977 ; Hernandez et Johnson, 1967 ; Macy et coll., 1976).

#### I.4.1.5. Les voies de synthèse des alcools

##### ✓ La synthèse de l'éthanol

La synthèse de l'éthanol résulte de l'action successive de 2 déshydrogénases NADH-dépendantes. L'acétyl-CoA est dans un premier temps réduit en acétaldéhyde par l'aldéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.10) en générant une mole de NAD<sup>+</sup> et en libérant le CoASH. L'acétaldéhyde est ensuite converti en éthanol par action de l'alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1) avec formation d'une mole de NAD<sup>+</sup>. Cette voie métabolique constitue l'un des principaux processus de régénération des équivalents réducteurs. Elle génère de plus, à partir de glycérol, une mole d'ATP par mole d'éthanol (Gottschalk, 1987) :

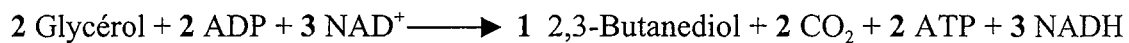


Ces deux étapes enzymatiques sont réalisées chez *E. coli* par une seule enzyme (Clark, 1989) codée par le gène *adhE* (Lorowitz et Clark, 1982 ; Cunnigham et Clark, 1986). Un tel système permet la proximité des deux sites catalytiques et évite ainsi la dispersion de l'acétaldéhyde, chimiquement très actif. Ce complexe enzymatique est composé de deux sous-unités de 96 KDa, chacune codée par un gène de 891 codons (Goodlove et coll., 1989). Bien que ces deux activités soient attribuées à une même protéine, leurs niveaux ne varient pas de la même façon à cause de la plus grande sensibilité à l'inactivation par le métabolisme aérobie du domaine alcool déshydrogénase du complexe enzymatique (Clark, 1989).

Chez *K. pneumoniae*, le niveau d'activité de l'alcool déshydrogénase, en anaérobiose, est d'autant plus élevé que la source carbonée apportée est réduite. Le fumarate réprime également la synthèse enzymatique, ce qui suggère que le potentiel d'oxydo-réduction intracellulaire contrôle le niveau d'induction de l'alcool déshydrogénase (Mac Phedran et coll., 1961). De plus, cette enzyme est faiblement induite en aérobie où les concentrations en cofacteurs nucléotidiques sont plus élevées (Wimpenny et Firth, 1972). Il est alors probable que le ratio NAD<sup>+</sup>/NADH soit un facteur déterminant dans l'expression du gène *adhE* (Lin et Iuchi, 1991). Le niveau d'expression du gène *adhE* de *E. coli* est diminué en présence de nitrate de façon plus marquée qu'en présence d'oxygène (Clark et Cronan, 1980). Ce processus de répression est lié, d'une part, à la protéine codée par l'opéron *nar* impliqué dans le métabolisme du nitrate et, d'autre part, à la réduction du nitrate qui abaisse le potentiel d'oxydoréduction de la cellule et indirectement l'expression du gène *adhE* (Chen et Lin, 1991). La voie métabolique de l'éthanol semble donc essentiellement régulée au niveau transcriptionnel.

## ✓ La synthèse de 2,3-butanediol

La synthèse du 2,3-butanediol nécessite l'intervention de l' $\alpha$ -acétolactate synthase couplée à la thiamine pyrophosphate (TPP). Une molécule de pyruvate réagit dans un premier temps avec le complexe enzyme-TPP pour former du  $\text{CO}_2$  et l'hydroxyéthylthiamine pyrophosphate liée à l'enzyme. Cet intermédiaire réactionnel réagit ensuite avec une seconde molécule de pyruvate pour former l' $\alpha$ -acétolactate tout en régénérant le complexe enzyme-TPP (Gottschalk, 1987). L' $\alpha$ -acétolactate ainsi généré est ensuite converti par l' $\alpha$ -acétolactate décarboxylase en acétoïne, puis réduit par la 2,3-butanediol déshydrogénase en 2,3-butanediol. Le bilan stoechiométrique à partir de glycérol est alors :

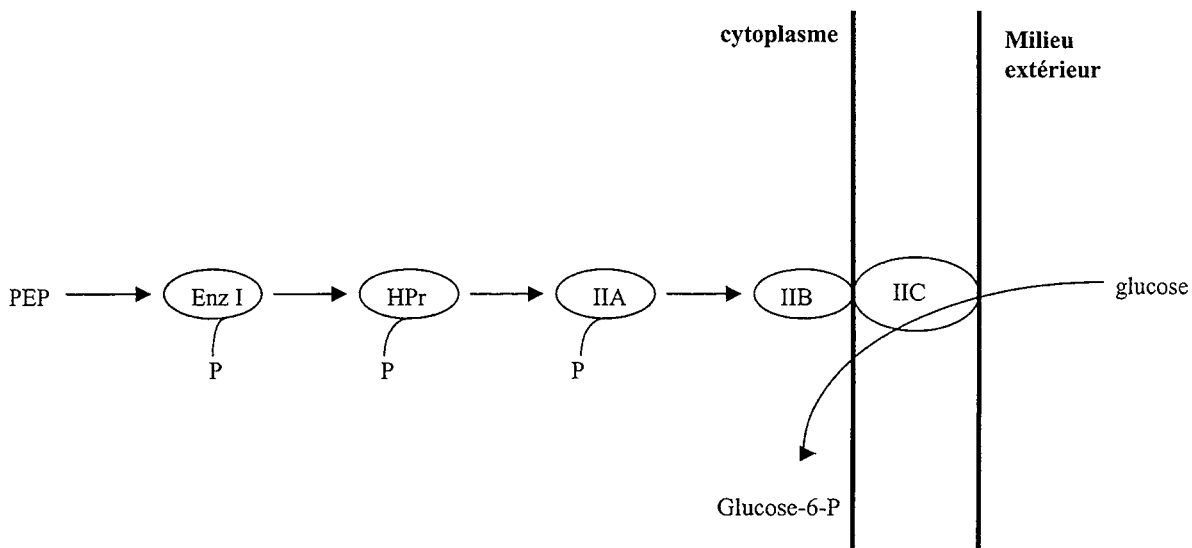


### I.4.2. Inhibition par les métabolites

#### I.4.2.1. Influence des substrats

##### I.4.2.1.1. La répression catabolique

Chez les bactéries anaérobies obligatoires et facultatives, un mécanisme de transport des glucides répandu est le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS) (**Figure 12**).



**Figure 12.** Système phosphotransférase phosphoénolpyruvate-dépendant (Mitchell, 1998).

Le système consiste en différents domaines identifiables formant une chaîne entre le phosphoénolpyruvate (PEP) et le substrat qui est phosphorylé à son entrée dans la cellule. Le domaine IIC est impliqué dans la translocation du substrat et n'est pas phosphorylé. Dans certains systèmes, les domaines IIA, IIB et IIC sont fusionnés pour donner une seule chaîne polypeptidique, alors que dans d'autres ils forment trois protéines séparées.



Le substrat est non seulement transporté à travers la membrane mais aussi phosphorylé pour un même coût d'énergie. Ce mécanisme est donc adopté par les bactéries anaérobies dont le métabolisme a un faible rendement énergétique.

Peu de choses sont connues sur les détails mécanistiques de la répression catabolique chez les Clostridia. Néanmoins, il semblerait qu'elles partagent quelques caractéristiques avec les autres bactéries Gram-positif (Mitchell, 1998). Chez *Bacillus subtilis*, il a été montré que le glucose inhibait le transport de substrat non PTS-dépendant comme le glycérol ou le maltose. Ainsi en absence de glucose, la glycérokinase est activée via une phosphorylation par l'enzyme I tandis qu'en présence de glucose, le phosphate est dévié afin de maintenir l'utilisation du glucose, inactivant alors le métabolisme du glycérol.

Il est possible que des mécanismes de ce type interviennent chez les Clostridia, mais il n'existe encore aucune preuve (Hueck et Hillen 1995). Cependant une protéine régulatrice située dans l'opéron mannitol a récemment été mise en évidence chez *Cl. acetobutylicum* DSM 792. (Behrens et coll., 2001).

Un mécanisme plus général de régulation identifié chez les bactéries Gram-positif est l'expulsion d'inducteurs : en présence de glucides prêts à être métabolisés, des composés inducteurs sont ainsi rapidement expulsés du cytoplasme. Il fait intervenir une protéine du système PTS, HPr, phosphorylée sur un résidu sérine. La récente démonstration de l'expulsion d'inducteurs (Diez-Gonzales et Russell, 1996) et la preuve préliminaire de la phosphorylation de HPr chez les Clostridia, ne laissent aucun doute sur la place majoritaire que tient le système PTS dans le mécanisme d'assimilation des glucides. Il pourrait également être impliqué dans la régulation. En effet, la protéine HPr stimulée par la présence de glucose pourrait interagir avec une protéine de contrôle négatif, Reg A, possédant un domaine de fixation à l'ADN (Davison et coll. 1995).

#### ***1.4.2.1.2. Inhibition par le glycérol***

Le glycérol est connu pour entrer dans la cellule grâce à une perméase par un mécanisme de diffusion facilitée (Sanno et coll., 1968). Le glycérol est un composé faiblement inhibiteur. La concentration maximale tolérée par *K. pneumoniae* et *C. butyricum* est 187,6 g/L d'après un modèle mathématique élaboré à partir de données expérimentales (Zeng et coll., 1994). Toutefois, une concentration inhibitrice plus faible de 97 g/L a été déterminée expérimentalement avec *C. butyricum* (Biebl, 1991).

Le glycérol est un soluté osmorégulateur (Castro et Loureiro-Dias, 1991). L'étude de l'effet du glycérol sur la réponse des liposomes après un stress osmotique a permis de déduire

que ce composé entraînait des modifications de la surface membranaire (Biondi et coll., 1991), impliquant une diminution de la polarité. Une modification de la perméabilité de la membrane cellulaire chez *Gluconobacter oxydans* a également été suggérée par Bories et coll. (1991) pour expliquer les très faibles cinétiques de croissance observées en présence de 100 g/L de glycérol.

#### I.4.2.2. Influence des produits

##### I.4.2.2.1. Les alcools

Il a été montré que les alcools affectaient l'organisation membranaire de plusieurs micro-organismes en augmentant la fluidité membranaire et en modifiant les interactions lipide-lipide et lipide-protéine (Jain et coll., 1978 ; Linden et Moreira, 1982). Ingram et Buttke (1984) rapportent que la toxicité de ces alcools est directement liée, non seulement à leur longueur de chaînes, mais aussi à leur hydrophobicité ; ils modifieraient la composition en acides gras de la membrane, et plus précisément le rapport acides gras saturés/acides gras insaturés ; ceci aurait pour conséquence des changements dans la longueur des chaînes acylées et dans la composition phospholipidique (Izard et coll., 1989 ; Lepage et coll., 1987). Les alcools à courtes chaînes, à dominante polaire, ont la capacité de s'insérer dans la bicouche lipidique du côté hydrophobe, réduisant ainsi le mouvement des chaînes acylées et la fluidité membranaire. Par contre, les alcools à longues chaînes ou cycliques introduisent des brèches dans la partie lipidique, augmentant le mouvement des chaînes hydrocarbonées et donc la fluidité membranaire (Jain et coll., 1978). Le 1,3-PPD étant moins polaire que le glycérol, son effet est ainsi moins marqué. Cette corrélation entre l'hydrophobicité des alcools et l'inhibition de la croissance cellulaire suggère fortement que la membrane soit le site d'interaction spécifique.

##### ✓ Le 1,3-propanediol

Bien qu'il ne possède que deux fonctions alcools, ce composé a un effet inhibiteur plus marqué. Les concentrations maximales tolérées par *K. pneumoniae* et *C. butyricum* sont de l'ordre de 65-70 g/L (Zeng et coll., 1991 ; Biebl, 1991). L'inhibition très marquée de la croissance par le 1,3-PPD a été décrite par Gray et Sova en 1956. Ces auteurs ont étudié l'effet des alcools primaires, des diols et des triols sur des cultures de *Saccharomyces cerevisiae*. Pour les alcools primaires, l'inhibition serait directement liée à la longueur des chaînes. Le 1,3-PPD est 42 fois plus inhibiteur que le 1,2-PPD, le glycérol ayant le même

effet que le 1,2-PPD. L'hypothèse tendant à montrer que la cellule aurait une perméabilité décroissante aux alcools quand le nombre de groupements hydroxyls augmente est contredite par le fait que le glycérol est moins inhibiteur que le 1,3-PPD. Ces auteurs suggèrent donc que l'effet inhibiteur très marqué de ce dernier est lié à la structure de la dihydroxyacétone ( $\text{CH}_2\text{OH-CO-CH}_2\text{OH}$ ) proche de celle du 1,3-PPD ( $\text{CH}_2\text{OH-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$ ). Il existerait une compétition vis à vis du substrat pour une enzyme du métabolisme. Plus récemment, Streekstra et coll. (1987) ont suggéré que la présence de 1,3-PPD exerce un effet négatif sur la valeur du  $Y_{\text{ATP}}$  d'une culture en continu de *K. pneumoniae* sur glycérol, par une étude comparative avec des valeurs observées sur glucose ou DHA.

### ✓ L'éthanol

Les seuils d'inhibition par l'éthanol sont beaucoup plus bas que ceux observés avec le 1,3-PPD. Les concentrations maximales tolérées sont en effet de 16,6 g/L chez *K. pneumoniae* et *C. butyricum* (Zeng et coll., 1994) et 22 g/L chez *Enterobacter aerogenes* (Zeng et Deckwer, 1991). L'effet de l'éthanol se situe à plusieurs niveaux (Ingram et Buttkle, 1984). Des études menées chez les levures du genre *Saccharomyces* ont montré que l'hexokinase, la phosphoglycérate kinase et la pyruvate kinase sont inhibées par l'éthanol (Nagodawithana et coll., 1977 ; Millar et coll., 1982 ; Pascual et coll., 1988) à des concentrations élevées. Au niveau membranaire, l'éthanol s'insère dans des parties hydrophobes de la bicouche lipidique en augmentant la polarité moyenne de cet environnement et réduisant ainsi son rôle de barrière (Ingram, 1976 ; 1986). D'autre part, il modifie les interactions hydrophobes de type lipide-lipide et lipide-protéine (Jain et coll., 1978), réduisant ainsi la fluidité apparente de la membrane et générant des processus d'inhibition des systèmes de transport (Leao et Van Uden, 1982 ; Loureiro-Dias et Peinado, 1982). La présence d'éthanol se manifeste également par une augmentation de l'influx passif de protons à travers la membrane plasmique (Leao et van Uden, 1984 ; Cartwright et coll., 1986) provoquant la réduction du gradient électrochimique existant de part et d'autre de la membrane plasmique, un abaissement du pH intracellulaire et un accroissement de l'activité ATPase plasmique. Ce dernier se traduit par un découplage entre les activités d'hydrolyse de l'ATP et d'extrusion de protons, susceptible de causer l'arrêt de la croissance (Meyrial, 1996).

### ✓ Le 2,3-butanediol

A la différence de l'éthanol, le 2,3-butanediol a une faible solubilité dans les lipides et est toxique dans la gamme de concentrations 40-90 g/L.

#### I.4.2.2.2. Les acides

L'inhibition de la croissance des Clostridia par les acides a été étudiée par différents auteurs: Baronofsky et coll., 1984 ; Herrero et coll., 1985a ; Fond et coll., 1985 ; Husemann et Papoutsakis, 1986.

Biebl (1991) a étudié l'inhibition potentielle de la croissance de *C. butyricum* par les acides acétique et butyrique. Les concentrations critiques de ces acides, à pH 6,5, (concentrations minimales pour lesquelles il y a inhibition totale de la croissance) sont de l'ordre de 27 g/L pour l'acide acétique (0,4 g/L d'acide non dissocié), et de 19 g/L pour l'acide butyrique (0,39 g/L d'acide non dissocié). Les concentrations d'acide acétique critiques pour la croissance d'autres micro-organismes sont du même ordre, 0,45 g/L d'acide non dissocié pour *Klebsiella oxytoca* et *Enterobacter aerogenes* (Fond et coll., 1985b ; Zeng et coll., 1990).

Les acides organiques jouent un rôle prépondérant dans la fermentation des Clostridia parce que, en plus de leurs propriétés inhibitrices de la croissance, ils participent à l'équilibre ionique du milieu (Leung et Wang, 1981). Leur influence dans l'équilibre ionique dépend du pH du milieu et du pKa des acides (4,82 pour l'acide butyrique et 4,76 pour l'acide acétique). L'inhibition par l'acide butyrique produit par les cellules est de 2,7 fois plus grande que celle obtenue avec l'acide butyrique ajouté dans le milieu de culture (Zeng et coll., 1994).

Il a été démontré que l'inhibition par l'acide acétique est due à sa forme non-dissociée (Husemann et Papoutsakis, 1986 ; Tang et coll., 1989 ; Zeng et coll., 1990). L'inhibition de croissance par l'acide butyrique dans la fermentation du glycérol peut être attribuée à sa concentration totale incluant la forme non-dissociée. Cependant le butyrate apparaît être plus toxique que l'acétate. Des différences significatives entre l'inhibition par l'acétate et celle due au butyrate ont aussi été reportées chez d'autres micro-organismes, en particulier pour *C. acetobutylicum* dans la fermentation acétone-butanol (Bahl et coll., 1982 ; Herrero et coll., 1985 ; Michel-Savin et coll., 1990). La toxicité de ces acides serait liée, en partie, à leur hydrophobicité, les formes non dissociées des acides pouvant diffuser passivement à travers la membrane cellulaire. Elles agissent ainsi comme agents découplants permettant l'entrée de protons dans la cellule (Husemann et Papoutsakis, 1986). Quand la concentration intracellulaire des formes non dissociées devient trop élevée, le gradient de pH à travers la

membrane est abolie et de ce fait les fonctions métaboliques sont inhibées (Baronofsky et coll., 1984 ; Herrero et coll., 1985).

Zeng et coll. (1993) ont montré qu'il existe un mécanisme de régulation chez *K. pneumoniae* qui permet la flexibilité des canaux de distribution des produits à travers l'interconversion du NADH et l'hydrogène sous différentes conditions. Deux voies de fermentations peuvent être distinguées ; (1) celle qui utilise la voie de production d'éthanol comme voie principale, (2) celle qui utilise la voie de production d'acétate comme principale voie génératrice d'énergie. Bien que la voie de production de l'éthanol soit plus efficace (elle permet un meilleur équilibre des éléments réduits), la voie de production de l'acétate peut être dominante dans les conditions d'inhibition par les produits, particulièrement à fort flux carboné (Zeng et coll., 1993).

Günzel (1991) montre que le rapport butyrate/acétate augmente quand le pH diminue. A pH neutre, il observe une augmentation de la production d'acétate et une diminution de la production du butyrate quand le taux de dilution augmente. Ces résultats peuvent être analysés en comparant l'inhibition par les différents produits à différents pH ; à pH acide, l'acétate étant plus toxique que le butyrate, la production d'acide butyrique est préférentielle.

#### **I.4.2.3. Influence des intermédiaires métaboliques**

##### ***I.4.2.3.1. Le méthylglyoxal***

L'accumulation de ce composé a été observée avec une souche mutante d' *E. coli* dont la glycérol kinase, contrôlant l'entrée du glycérol, est insensible à l'inhibition par le fructose 1,6-diphosphate (Freedberg et coll., 1971). Une assimilation non régulée du glycérol entraîne alors l'accumulation intracellulaire de DHAP, ce qui provoque la synthèse de méthylglyoxal synthase et finalement la production de méthylglyoxal, composé toxique pour la cellule.

Le méthylglyoxal a un effet cytotoxique très marqué pour de faibles concentrations de l'ordre du millimolaire. Les mécanismes d'inhibition par ce composé sont nombreux. Les travaux de Együd et Szent-Györgyi (1966) et Otsuka et Együd (1968) ont montré in vitro l'effet léthal du méthylglyoxal sur la synthèse protéique, travaux confirmés in vivo par Zwaig et Dieguez (1970) et Krymkiewicz et coll.(1971). Le site d'action du méthylglyoxal serait alors le ribosome au niveau des résidus 7-méthylguanine présents dans l'ARN 16S et 23S (Otsuka et Együd, 1968 ; Branlant et coll., 1981). Le méthylglyoxal semble interférer également au niveau de l'activité de plusieurs enzymes possédant un groupement sulfhydryl (Együd et Szent-Györgyi, 1966 ; Kun, 1950). Du fait de sa réactivité, la toxicité du

méthylglyoxal se manifeste auprès de nombreux autres organites cellulaires (Inoue et Kimura, 1995). Il a été proposé récemment que la glycérol déshydrogénase de *Clostridium beijerinckii* et *Clostridium difficile* pouvait jouer un rôle de détoxification du méthyl glyoxal (Liyanage et al., 2001).

#### ***1.4.2.3.2. Le 3-hydroxypropionaldéhyde***

La présence de ce composé a été observée dans un premier temps lors de la fermentation alcoolique. Attribuée à l'action de contaminants sur le glycérol, produit secondaire de cette fermentation, l'accumulation d'acroléine, en équilibre chimique avec le 3-HPA en solution aqueuse, a fait l'objet de nombreux travaux (Voisenet, 1910 ; Serjak et coll., 1954). Sobolov et Smiley (1960) ont ensuite attribué la formation de l'acroléine à la conversion du glycérol par une souche du genre *Lactobacillus*.

Plus récemment, l'accumulation de reutérine, correspondant au 3-HPA en équilibre avec ses formes dimérique et hydratée (Talarico et Dobrogosz, 1989), a été décrite chez *L. reuteri* à partir de glycérol (Axelsson et coll., 1989 ; Talarico et coll., 1988) dans des conditions de pH, température et d'anaérobiose semblables à celles probablement présentes dans l'appareil gastrointestinal humain. L'effet bactéricide de ce composé, testé sur de nombreuses souches bactériennes, est extrêmement puissant et s'avère toutefois moins prononcé sur les bactéries lactiques (Axelsson et coll., 1989 ; Chung et coll., 1989). La synthèse de 3-HPA par *L. reuteri* pourrait ainsi constituer un processus de régulation de l'écosystème microbien de l'appareil digestif (Chung et coll., 1989).

L'accumulation du 3-HPA a été aussi étudiée chez *E. agglomerans* (Barbirato et coll., 1996). Elle se traduit par une diminution de la vitesse de croissance et de métabolisation du glycérol. La vitesse spécifique de consommation du substrat décroît en effet rapidement, simultanément à l'apparition du 3-HPA. D'autre part, l'évolution in vitro des activités glycérol déshydrogénase, DHA kinase, glycérol déshydratase et 1,3-PPD déshydrogénase, pendant une culture en discontinu, présente une chute plus ou moins marquée consécutivement à l'apparition du 3-HPA. Cette évolution justifie la diminution des cinétiques de consommation du substrat. L'effet du 3-HPA sur ces quatre enzymes étant réversible, les niveaux d'induction mesurés reflètent une baisse de l'activité de synthèse de ces protéines, suggérant l'existence d'une relation entre le 3-HPA et la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour ces enzymes.

L'inhibition totale de la réaction biologique a lieu pour une concentration en 3-HPA de 30 mM, quel que soit le pH de la culture, et se maintient même après douze jours de culture.

L'effet du 3-HPA est toutefois réversible. L'effet inhibiteur du 3-HPA sur la glycérol déshydrogénase est, vraisemblablement, l'une des premières manifestations de l'inhibition par le 3-HPA. En effet, la consommation du glucose et du pyruvate est également stoppée lors de l'accumulation du 3-HPA. L'inhibition semble vraisemblablement liée à la nature du 3-HPA et plus précisément à sa forte réactivité.

Au même titre que l'acétaldéhyde (Jones, 1989), cet aldéhyde réagit avec des fonctions amines situées sur des constituants indispensables à l'activité cellulaire, telles que les protéines impliquées dans la synthèse ou la duplication de l'ADN (Talarico et Dobrogosz, 1989). Cette propriété explique certainement le large spectre d'action du 3-HPA.

L'addition de 3-HPA chimique entraîne, en effet, l'accumulation immédiate de 3-HPA naturel jusqu'à une concentration globale de l'ordre de 30 mM. La rupture de l'équilibre entre les activités catalytiques de la voie de formation du 1,3-PPD peut donc être provoquée par ajout de 3-HPA exogène. L'accumulation de 3-HPA à un certain stade de fermentation est représentative d'un déséquilibre métabolique assimilable à un accident physiologique. Les raisons pour une souche de produire cette substance toxique jusqu'à inhibition de sa croissance et de ses activités biologiques sont en effet plutôt obscures. Ce phénomène, subi par la bactérie, reflète éventuellement des conditions de culture mal adaptées aux aptitudes fermentaires de la souche : pH 7 et 30°C sont des conditions opératoires optimisées sur des critères de taux de croissance pour une concentration initiale en glycérol de 20 g/L.

Le mode d'action du 3-HPA reste méconnu. Des travaux ont toutefois montré que la reutérine inhibe in vitro l'activité de la ribonucléotide réductase d' *E. coli*, enzyme intervenant dans les premières étapes de synthèse de l'ADN. Ces résultats permettraient d'expliquer la largeur du spectre d'action de la reutérine vis à vis des micro-organismes (Talarico et Dobrogosz, 1989).

Une méthode de production du 3-HPA par *K. pneumoniae* a été mise au point. Basée sur les propriétés du semicarbazide à piéger le 3-HPA (Abeles et coll., 1960), cette méthode a été optimisée pour finalement conduire à des concentrations de 46 g/L de 3-HPA sous forme complexée avec le semicarbazide (Slininger et coll., 1983 ; Slininger et Bothast, 1985 ; Vancauwenberge et coll., 1990).

#### ***I.4.2.3.3. Autres intermédiaires métaboliques***

Parmi les intermédiaires métaboliques rencontrés dans le catabolisme anaérobie des entérobactéries, l'acétaldéhyde, les triose-phosphates et le pyruvate possèdent des propriétés inhibitrices marquées.

L'inhibition par l'acétaldéhyde a fait l'objet de travaux récents. L'accumulation intracellulaire de ce métabolite est en effet à l'origine d'inhibition de croissance chez *Zymomonas mobilis* (Ishikawa et coll., 1990) et chez *S. cerevisiae* pour des concentrations de seulement 0,3 g/L (Stanley et coll., 1993). Une telle accumulation résulterait d'un ratio NAD<sup>+</sup>/NADH trop élevé (Jones, 1989). L'effet toxique de l'acétaldéhyde est dû à la forte réactivité de la fonction aldéhyde avec la fonction amine des composés cellulaires pour former des bases de Schiff, affectant ainsi l'activité des protéines, la synthèse de l'ARN et de l'ADN (Jones, 1989).

Peu de travaux relatent l'effet inhibiteur des trioses-phosphates, du GAP du DHAP, et du pyruvate. Le GAP et le DHAP étant des composés phosphorylés riches en énergie, la toxicité de ces métabolites est directement liée à leur grande réactivité (Böck et Neidhart, 1966 ; Cozzarelli et coll., 1965). Le caractère inhibiteur du pyruvate s'explique par sa fonction acide susceptible de provoquer des variations locales de pH intracellulaire (Collins, 1972).

### **I.4.3. Cas particulier de *Clostridium butyricum***

#### **I.4.3.1. Micro-organisme**

*Clostridium butyricum* appartient au genre *Clostridium* qui regroupe les bactéries anaérobies strictes, sporulantes et incapables de réduire le sulfate (Buchanan et Gibbons, 1974). A l'état végétatif, cette bactérie se présente sous forme de bâtonnets droits aux extrémités arrondies. Mobile par des flagelles péritriches, elle est Gram positive, au moins dans les premières heures de croissance et devient Gram négative lorsque les cultures sont âgées. Sa longueur varie de 3 à 7 µm et sa largeur de 0,6 à 1,2 µm. Ces valeurs dépendent de la souche considérée, des conditions de culture et de l'âge du micro-organisme.

Les spores, ovoïdes et réfringentes, sont subterminales ; elles tolèrent l'oxygène et sont thermorésistantes.

#### **I.4.3.2. Conditions de culture**

*Clostridium butyricum* est un micro-organisme qui possède des activités saccharolytiques. Il est capable de dégrader de nombreuses sources de carbone, dont l'amidon et la plupart des hexoses et pentoses ainsi que des polyols comme le glycérol. La biotine et l'acide para-aminobenzoïque sont les facteurs de croissance nécessaires en milieu synthétique (Lampen et Peterson, 1943). La température optimale de croissance se situe entre 25 et 37 °C.



Le mannitol est uniquement fermenté en présence d'un co-substrat (glucose ou acétate) ; le butyrate, le CO<sub>2</sub> et l'hydrogène sont les produits majeurs de fermentation (Heyndrickx et coll., 1989). Récemment, Heyndrickx et coll. (1991b) ont réussi à cultiver ce micro-organisme sur un milieu minimal contenant du D-xylose comme unique source de carbone et d'énergie. En culture continue limitée en carbone, ils obtiennent le même spectre de produits qu'avec le glucose, dans une gamme de pH compris entre 5.5 et 7.0.

*C. butyricum* est connu pour produire de grandes quantités d'hydrogène moléculaire à partir du glucose (Karube et coll., 1976), les seuls autres produits formés étant l'acétate, le butyrate et le dioxyde de carbone (Crabbendam et coll., 1985). Heyndrickx et coll. (1986) ont montré que pour des cultures continues régulées à des pH compris entre 5,5 et 7,1 les gaz produits étaient constitués de 60% d'H<sub>2</sub> et de 40% de CO<sub>2</sub>. Ces mêmes auteurs (1987), étudiant l'effet du pH sur des cultures discontinues de *C. butyricum*, observent une diminution de la production de H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> liée à une augmentation du pH ; la production de butyrate diminue alors que celle d'acétate augmente légèrement ou reste constante. De plus, à des pH supérieurs à 6,0, deux nouveaux produits sont synthétisés : le lactate et le formiate, ces composés agissant comme accepteurs d'électrons additionnels. Pour Crabbendam et coll. (1985), deux conditions seulement entraînent une diminution du rapport acétate/butyrate :

1. lorsqu'une culture continue limitée en glucose n'est pas sous barbotage d'azote
2. lorsque des quantités croissantes de mannitol sont ajoutées à cette culture.

#### **I.4.3.3. Performances fermentaires**

La fermentation du glycérol en 1,3-propanediol, butyrate et acétate chez *C. butyricum*, a été décrite pour la première fois par Forsberg en 1987. Curieusement, Heyndrickx et coll. (1991a) montrent qu'en culture en chemostat, ce micro-organisme convertit 65% du glycérol en 1,3-PPD et ceci sans production d'hydrogène moléculaire. Les mêmes observations sont faites chez *C. butyricum* CNCM 1.1211 (Claret, 1992). Cette bactérie a une bonne croissance lorsque le pH de la culture est compris entre 6 et 7,5, avec un optimum à 6,5 (Biebl et coll., 1992). Les produits formés influencent fortement la croissance. Ainsi, à pH 6,5, 60 g/L de 1,3-PPD, 27 g/L d'acide acétique et 19 g/L d'acide butyrique sont totalement inhibiteurs de la croissance. Une inhibition significative par le substrat n'est obtenue qu'à des concentrations en glycérol supérieures à 80 g/L (Biebl, 1991). Malgré cela, des concentrations en 1,3-PPD de 58 g/L ont été obtenues lors de cultures en fed-batch avec une productivité de 2,3-2,9 g/L.h (Günzel et coll., 1991).

Les caractéristiques fermentaires (cinétiques et rendements de production) de la conversion du glycérol en 1,3-propanediol en système batch par divers micro-organismes (Clostridia et Enterobactéries) sont reportées dans le **tableau V**.

**Tableau V.** Performances fermentaires obtenues au cours de la conversion du glycérol en 1,3-propanediol par divers micro-organismes.

Micro-organisme conditions	Rendement molaire	Productivité moyenne(g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Co-métabolites	Références
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM2026 ; glycérol 96 g/L	0,54	2,3	Acétate, lactate, éthanol	Kretschmann et coll. (1990)
<i>Klebsiella oxytoca</i> DSM3006 ; glycérol 50 g/L	0,36	0,49	éthanol, acétate, lactate	Homann et coll. (1990)
<i>Citrobacter freundii</i> glycérol 20 g/L	0,64	0,92	acétate, éthanol, lactate	Homann et coll. (1990)
glycérol 50 g/L	0,64	1,33		
<i>Citrobacter freundii</i> DSM 30040	0,55	0,75	lactate,acétate, pyruvate	Gottschalk et Averhoff (1990)
<i>Clostridium butyricum</i> B593, glycérol 10 g/L	0,61	n.d	butyrate, propionate, acétate	Forsberg (1987)
<i>Clostridium butyricum</i> DSM 5431, glycérol	0,66	0,58	acétate, butyrate	Biebl (1991)
<i>Clostridium butyricum</i> VPI 3266	0,65	0,72	butyrate	Saint- Amans et coll. (1994)

n.d: non déterminé

Cette comparaison montre que le rendement de production du 1,3-propanediol dépend de la souche utilisée. Le micro-organisme le plus performant par rapport à ce critère est *Clostridium butyricum* DSM 5431 (Biebl, 1991), qui montre un taux de conversion du glycérol en 1,3-propanediol de 66%. Les variations de rendement sont à relier aux différences de profil des divers co-produits de conversion du glycérol des bactéries utilisées : plus la formation de ces co-métabolites sera génératrice d'équivalents réducteurs, plus le flux de substrat converti en 1,3-propanediol sera important .

D'un point de vue productivité, la vitesse maximale de biosynthèse du 1,3-propanediol a été observée chez *K. pneumoniae* DSM 2026, à pH 7 sur milieu minéral supplémenté en extrait de levure contenant initialement 96 g/L de glycérol.

Il est cependant difficile de sélectionner d'après ces données le micro-organisme le plus intéressant sur le plan cinétique car les valeurs citées ayant été obtenues dans des conditions opératoires différentes et pas toujours optimisées.

#### I.4.3.4. Les voies métaboliques

Les voies métaboliques de dégradation des glucides par *C. butyricum* sont maintenant parfaitement établies (Doëlle, 1975 ; Petitdemange, 1976 ; Crabbendam et coll., 1985). Les hexoses sont dégradés par la voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas avec conversion d'une mole d'hexose en deux moles de pyruvate, accompagnée de la formation de 2 moles d'ATP et de 2 moles de NADH. Les pentoses sont métabolisés par la voie des pentoses-phosphate (Volesky et Szczesny, 1983). Ils sont tout d'abord transformés en pentoses-5-phosphate et ensuite, via la séquence transcétolase/transaldolase, en fructose-6-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate, composés entrant dans la voie de la glycolyse. Ainsi, la consommation de 3 moles de pentoses conduit à la production de 5 moles d'ATP et de 5 moles de NADH.

##### I.4.3.4.1. Fermentation du glucose

Le catabolisme du glucose par *C. butyricum* est représentatif d'une fermentation butyrique type avec formation d'acides butyrique et acétique. Le rapport H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> est supérieur à 1, l'excès d'hydrogène étant dû à l'activité NADH-ferrédoxine réductasique. Le catabolisme du glucose ne produit pas de 1,3-PPD.

La formation d'acétate à partir de glucose peut être écrite ainsi:



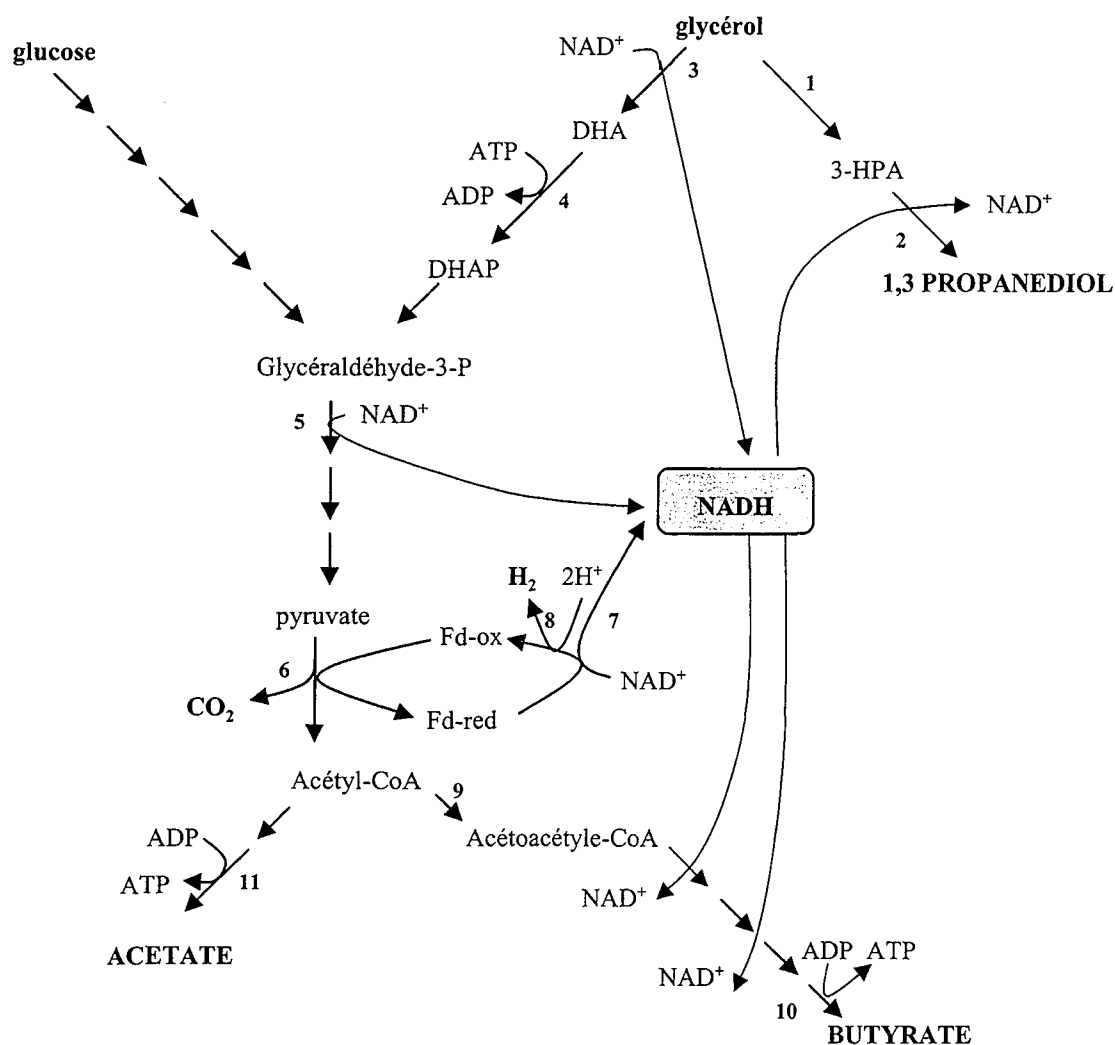
La formation de butyrate à partir de glucose peut être écrite ainsi:



##### I.4.3.4.2. Fermentation du glycérol

*Clostridium butyricum* produit principalement le 1,3-PPD, l'acétate et le butyrate à partir de glycérol (Biebl et coll., 1992).

Le glycérol est fermenté selon deux voies (**Figure 13**):



**Figure 13.** Schéma du catabolisme du glucose et du glycérol chez *C. butyricum* (d'après Abbad-Andaloussi et coll., 1996b).

1. Glycérol déshydratase ; 2. 1,3-PPD déshydrogénase ; 3. Glycérol déshydrogénase ;
4. Dihydroxyacétone kinase ; 5. Glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase ; 6. Pyruvate ferrédoxine oxydoréductase ; 7. NADH-ferrédoxine oxydoréductase ; 8. Hydrogénase ;
9. Thiolase ; 10. Butyrate kinase ; 11. Acétate kinase.

### ✓ La voie oxydative

Chez *C. butyricum*, le glycérol est oxydé en dihydroxyacétone par l'intermédiaire d'une glycérol déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante. Ce composé est ensuite phosphorylé en DHAP par une kinase avant d'entrer dans la glycolyse. La conversion d'une mole de glycérol en pyruvate (produit final de la glycolyse) conduit à la production d'une mole d'ATP et de 2 moles de NADH. Pour une même quantité de carbone, la quantité de NADH produite à partir du glycérol est 2 fois supérieure à celle produite sur glucose. Le pyruvate subit une décarboxylation oxydative pour former l'acétyl-phosphate, du dioxyde de carbone et de l'hydrogène. Ce mode d'oxydation, appelé réaction phosphoroclastique, fait intervenir trois enzymes: la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase, l'hydrogénase et la phosphotransacétylase. De plus, elle nécessite la présence de coenzymeA, de phosphate et d'un transporteur d'électrons: la ferrédoxine (Mortlock et coll., 1959 ; Mortenson et coll., 1963). Cependant la réaction peut ne pas être complète et s'arrêter à la formation d'acétyl-CoA, point de départ de la synthèse de l'acétate et du butyrate.

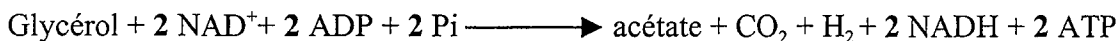
### ✓ La voie réductrice

Le catabolisme du glycérol par la voie de la DHA ne nécessitant pas d'accepteurs d'électrons exogènes, le NADH produit est en partie régénéré par une voie parallèle qui implique la conversion du glycérol en 3-HPA, suivie de sa réduction en 1,3-propanediol (Abeles et coll., 1960).

La première étape de cette voie réductrice implique une déshydratase coenzyme B<sub>12</sub>-dépendante qui transforme le glycérol en 3-HPA qui est ensuite réduit en 1,3-PPD par une 1,3-PPD déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante. Le produit final, le 1,3-PPD est produit spécifiquement par la fermentation du glycérol et ne peut être obtenu à partir d'une autre conversion anaérobie.

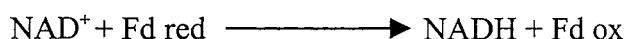
La voie de formation du 1,3-PPD ne produit pas d'énergie mais utilise des éléments réducteurs alors que la voie glycérol-acétate conduit, par molécule de glycérol catabolisé, à la formation de 2 molécules d'ATP, d'une molécule de NADH + H<sup>+</sup> et d'une molécule d'hydrogène. La voie glycérol-butyrate conduit, pour deux molécules de glycérol catabolisé, à la formation de trois molécules d'ATP et de deux molécules d'hydrogène. La voie glycérol-acétate est indispensable pour la bactérie puisqu'elle fournit l'énergie nécessaire à la croissance et à la maintenance de la cellule. Par contre, la voie glycérol-butyrate n'est pas indispensable, elle est même indésirable car elle se trouve en compétition avec la voie glycérol-1,3-PPD dans l'utilisation du NADH. Les quantités de NADH maximales ou

minimales formées peuvent être calculées suivant l'équation de conversion du glycérol en acétate et butyrate :

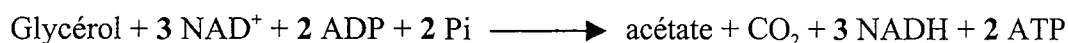


Le NADH est formé par la glycérol déshydrogénase et la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; l'ATP est formé par la phosphoglycérate kinase, la pyruvate kinase et l'acétate kinase ; cependant la DHA kinase utilise une molécule d'ATP.

Si la ferrédoxine réduite (Fd red) n'est pas réoxydée par l'hydrogénase mais entièrement réoxydée par une ferrédoxine-NAD<sup>+</sup>réductase suivant :

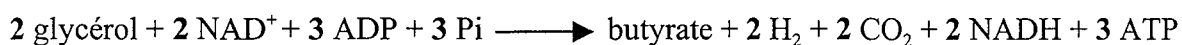


la conversion du glycérol devient:



La quantité de NADH minimale formée via la voie de production de l'acétate est de 2 moles et la quantité maximale de 3 moles. Ainsi la production de 1,3-PPD correspondante doit être comprise entre 2 et 3 moles.

La conversion du glycérol en butyrate peut alors être écrite ainsi:



La quantité de NADH minimale formée via la voie de production de butyrate est de 2 moles et la quantité maximale de 4 moles. Ainsi la production de 1,3-PPD correspondante doit être comprise entre 2 et 4 moles.

Le facteur limitant de la conversion du glycérol en 1,3-PPD, acétate et butyrate par *Cl. butyricum* résulte de l'inhibition de la croissance par les produits. Le 1,3-PPD est le produit le moins toxique car il est toléré jusqu'à une concentration de 60 g/L. Les acides acétique et butyrique causent une inhibition plus importante: 27 g/L et 19 g/L sont suffisants pour arrêter totalement la croissance (Biebl, 1991). Il est à noter qu'à des concentrations initiales de glycérol supérieures à 80 g/L, on observe un début d'inhibition de croissance de la bactérie (Boenigk et coll., 1993).

#### ***1.4.3.4.3. La réaction phosphoroclastique***

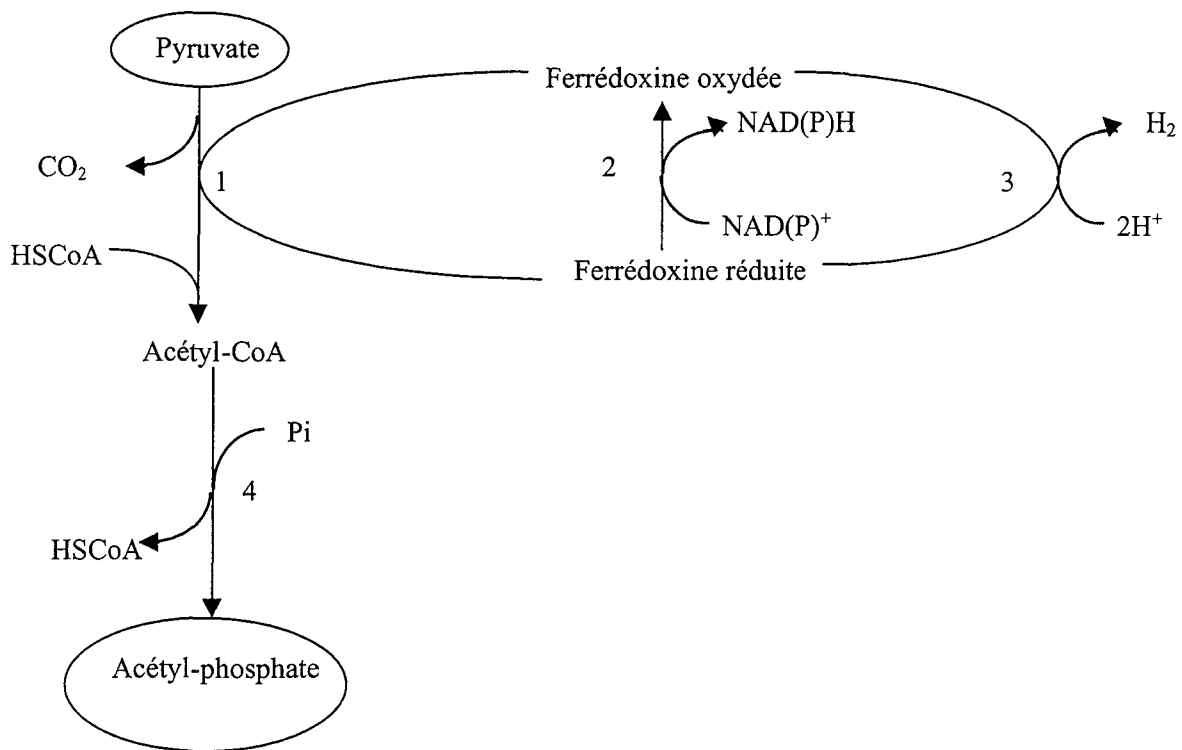
Cette réaction, spécifique des Clostridia, consiste en une décarboxylation oxydative du pyruvate pour former de l'acétyl-phosphate, du dioxyde de carbone et de l'hydrogène. L'acétyl-phosphate mène ultérieurement à la synthèse d'acétate et d'ATP (**Figure 14**). Ce mode d'oxydation appelé réaction phosphoroclastique, fait intervenir trois enzymes: la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase, l'hydrogénase et la phosphotransacétylase. De plus, elle nécessite la présence de coenzyme A., de phosphate et d'un transporteur d'électrons: la ferrédoxine, protéine à fer non hémique et soufre capable d'accepter ou de céder des électrons à très bas potentiel (Mortlock et coll., 1959; Mortenson et coll., 1963).

La ferrédoxine a été isolée chez *C. pasteurianum* (Mortenson et coll., 1962) et *C. acetobutylicum* (Marczak et coll., 1985).

Son potentiel d'oxydo-réduction standard est de  $-423 \pm 1,5$  mV avec une variation de 11,5 mV par unité pH (Moulis et Meyer, 1982). Le transfert électronique opéré par les ferrédoxine oxydoréductases peut, dans certains cas, aboutir à la production d'hydrogène via une hydrogénase dont l'activité permet également de maintenir un  $\Delta$ pH transmembranaire positif (Girbal et coll., 1994). La présence d'une autre protéine transporteuse d'électrons, la rubrédoxine, couplée à la NADH-rubrédoxine oxydo-réductase, semble également tenir un rôle important dans la distribution des électrons des Clostridia (Marczak et coll., 1984 ; 1985). Toutefois sa fonction physiologique reste à définir.

L'activité hydrogénase est également fonction du degré global de réduction des substrats: l'utilisation d'un mélange glucose-glycérol permet en effet de réduire la production d'hydrogène comparativement à celle observée par apport exclusif de glucose (Saint Amans, 1994). L'utilisation exclusive de glycérol la supprime totalement (Heyndrickx et coll., 1991a). Enfin, le rôle de l'hydrogénase peut être également minimisé grâce au maintien de la balance d'oxydo-réduction par la ferrédoxine-NAD<sup>+</sup>: réductase couplée à la voie du 1,3-PPD (Abbad-Andaloussi et coll., 1996b).

Cette voie permet d'obtenir des éléments réducteurs nécessaires, par exemple, pour la réduction du 3-HPA en 1,3-PPD. Sur le substrat glycérol, l'enzyme clé est la NADH ferrédoxine oxydoréductase qui entre en compétition avec l'hydrogénase dans l'utilisation des éléments réducteurs issus de la ferrédoxine. Ainsi lors de la fermentation de glycérol par *Cl. butyricum*, le rendement en 1,3-PPD est supérieur à celui attendu, compte tenu de la production de NADH lors de la formation d'acides. La production de H<sub>2</sub> est alors plus faible que celle d'une fermentation sur glucose (Jungermann et coll., 1976; Petitdemange et coll., 1976).



**Figure 14.** Réaction phosphoroclastique.

**1.** Pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase. **2.** Ferrédoxine-NAD(P)H réductase.

**3.** Hydrogénase. **4.** Phosphotransacétylase.



### I.4.3.5. La fermentation du glycérol par différentes souches de *C. butyricum*

#### I.4.3.5.1. En batch et en fed-batch

La fermentation du glycérol a été étudiée chez trois souches de *C. butyricum* :

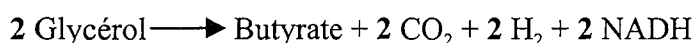
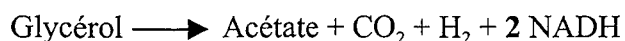
- *Clostridium butyricum* DSM 5431 (Biebl et coll., 1992) ;
- *Clostridium butyricum* VPI 3266 (Saint-Amans et coll., 1994) ;
- *Clostridium butyricum* E5 (Petitdemange et coll., 1995).

#### ✓ *Clostridium butyricum* DSM 5431

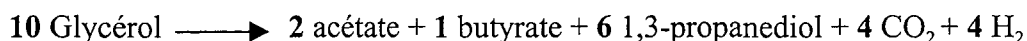
La souche de *Clostridium butyricum* DSM 5431 est capable de convertir plus de 110 g/L de glycérol en 56 g/L de 1,3-propanediol en 29 h.

La meilleure productivité totale est obtenue en culture fed-batch avec une concentration initiale de 5% de glycérol. En culture batch, 5% de glycérol ont un meilleur taux de conversion que 2,5%, mais à partir d'une concentration de 11% la productivité diminue.

La conversion du glycérol en produits peut être écrite ainsi :



La proportion molaire des acides acétique et butyrique en culture batch étant 2 :1, l'équation de fermentation s'écrit ainsi :



Günzel et coll, (1991) ont montré que la consommation complète du glycérol et la meilleure productivité de 1,3-propanediol par *C. butyricum* DSM 5431 en culture batch est obtenue à la température de 35°C (**Tableau VI**).

**Tableau VI.** Comparaison de la culture en batch et en fed-batch de *Clostridium butyricum* DSM 5431 sur glycérol d'après Abbad-Andaloussi et coll. (1995).

Mode de fermentation	Glycérol utilisé (g/L)	Acétate (g/L)	Butyrate (g/L)	1,3-PPD (g/L)	Acétate butyrate	Recouvrement carboné (%)	Rendement en 1,3-PPD
Batch	62	9,3	2,7	31,3	3,44	96	0,51
Fed-batch	87,4	14,5	6,2	44,6	2,33	96	0,51

A cette température, l'effet du pH a été étudié, les meilleurs résultats ont été obtenus entre pH 6,6 et 7,0. Le rendement en produits est d'environ 0,60 mole de 1,3-propanediol/mole de glycérol consommé.

Il a été montré que sous des conditions optimales de fermentation sur glycérol, *C. butyricum* DSM 5431 (Biebl et coll., 1992) et *K. pneumoniae* DSM 2026 (Forage et Foster, 1982) produisent la même concentration finale de 1,3-propanediol (56 g/L) et ont la même productivité (2,2-2,3 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

Abbad-Andaloussi et coll.(1995) ont obtenu des mutants à partir de la souche *C. butyricum* DSM 5431 en combinant les pressions de sélection telles que la résistance aux produits et à de fortes concentrations en bromure-bromate. Ces mutants sont altérés dans les productions d'acides et d'hydrogène. Ils montrent des caractéristiques très similaires et présentent les différences suivantes par rapport à la souche sauvage:

- ❑ ils produisent plus de biomasse que la souche sauvage, résultat de la plus grande résistance au 1,3-PPD.
- ❑ ils produisent moins d'acides totaux mais plus d'acide butyrique que d'acide acétique résultat de la sélection au bromure-bromate.
- ❑ ils ne dégagent plus d'hydrogène puisque le recouvrement en NADH varie entre 97 et 100% alors qu'il est de 70% pour la souche sauvage. Ce changement ne profite pas à la production du 1,3-PPD mais à la biosynthèse du butyrate puisque la bioconversion du glycérol en 1,3-PPD (mole/mole) ne varie pas d'une façon significative.

Ces mutants sont plus résistants que la souche sauvage puisqu'ils sont capables de fermenter en fed-batch des concentrations de glycérol comprise entre 120 et 130 g/L et de produire des concentrations élevées de 1,3-PPD de l'ordre de 65-70 g/L (**Tableau VII**).

**Tableau VII.** Comparaison de la culture en batch et en fed-batch de *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutant sur glycérol d'après Abbad- Andaloussi et coll. (1995).

Mode de fermentation	Glycérol utilisé (g/L)	Acétate (g/L)	Butyrate (g/L)	1,3-PPD (g/L)	Acétate butyrate	Recouvrement carboné (%)	Rendement en 1,3-PPD
Batch	62	3,8	5,2	32,4	0,72	95	0,63
Fed-batch	130	11,0	12,0	70,6	0,92	98	0,65

✓ *Clostridium butyricum* VPI 3266

La fermentation du glycérol par *C. butyricum* VPI 3266, ne produit pas d'hydrogène, le seul gaz produit étant le CO<sub>2</sub>. En batch, une bonne corrélation est observée entre la production de CO<sub>2</sub> et la consommation du glycérol. La concentration du 1,3-propanediol et la productivité sont significativement plus élevées en culture fed-batch qu'en culture batch (**Tableau VIII**). Cette différence est due au fait que le fed-batch empêche le phénomène d'inhibition par le substrat, tandis qu'en culture batch l'inhibition par des concentrations initiales élevées de substrat limite la concentration finale de 1,3-propanediol.

En culture fed-batch, 65 g/L de 1,3-propanediol sont produits avec une productivité de 1,21 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> et un rendement en 1,3-propanediol de 0,56. La concentration finale de 1,3-propanediol (56 g/L) obtenue avec la souche DSM 5431 est plus faible que celle obtenue avec la souche VPI 3266 (65 g/L).

**Tableau VIII.** Comparaison de la culture en batch et en fed-batch chez *Clostridium butyricum* VPI 3266 d'après Saint-Amans et coll. (1994).

Mode de fermentation	Butyrate (g/L)	1,3-PPD (g/L)	Concentration en biomasse (g/L)	Productivité en 1,3-PPD (g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Rendement en 1,3-PPD
Batch	7,5	35	1,5	0,72	0,54
Fed-batch	15	65	2,8	1,21	0,57

✓ *Clostridium butyricum* E5

*Clostridium butyricum* E5 fermente le glycérol et produit le 1,3-propanediol comme produit majeur de la fermentation avec production concomitante d'acétate et de butyrate. Les résultats de la culture en batch et fed-batch de *C. butyricum* E5 sur glycérol sont représentés dans le **tableau IX**.

**Tableau IX.** Comparaison des cultures en batch et en fed-batch de *Clostridium butyricum* E5 sur glycérol d'après Petitdemange et coll. (1995).

Mode de fermentation	Glycérol utilisé (g/L)	Acétate (g/L)	Butyrate (g/L)	1,3-PPD (g/L)	Acétate butyrate	Recouvrement carboné (%)	Rendement en 1,3-PPD
Batch	53,0	3,0	5,5	29,2	0,54	98	0,55
Fed-batch	122	2	15,3	65,6	0,13	95	0,54

D'après ce tableau, on remarque que le rapport butyrate/acétate est très influencé par le mode de culture : l'acide butyrique est produit en plus grande quantité en culture fed-batch qu'en culture batch.

*C. butyricum* E5 est très résistant à de grandes concentrations de glycérol et de 1,3-propanediol. La concentration finale en 1,3-propanediol de 70 g/L produite par *C. butyricum* E5 à partir de 118 g/L de glycérol est la plus élevée reportée dans la littérature.

Abbad-Andaloussi et coll. (1996a) ont isolé à partir de *C. butyricum* E5 des mutants résistants à l'alcool allylique par mutagenèse d'une culture *C. butyricum* E5 en phase exponentielle par la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine afin d'obtenir un taux de survie de l'ordre de 1%. Les cellules ont été étalées sur boîte de Pétri et des petits disques de papier filtre ont été déposés sur la surface et imprégnés par l'alcool allylique. Après incubation en anaérobiose les colonies qui apparaissent dans la zone claire sont repiquées sur un milieu RCM. Après croissance, les cellules sont à nouveau sélectionnées par étalement sur boîtes de Pétri contenant un milieu de culture additionné de 3 g/L d'alcool allylique.

Ces mutants obtenus par sélection à l'alcool allylique possèdent des caractéristiques similaires et présentent les différences suivantes par rapport à la souche sauvage:

- ils produisent moins de butyrate que d'acétate (**Tableau X**).

**Tableau X.** Fermentation de *C. butyricum* E5 mutant sur glycérol (673 mM) en culture batch d'après Abbad-Andaloussi et coll. (1996a).

Mode de fermentation	Glycérol utilisé (g/L)	Acétate (g/L)	Butyrate (g/L)	1,3-PPD (g/L)	Acétate butyrate	Recouvrement carboné (%)	Rendement en 1,3-PPD
Batch	51	10	3,8	32,1	3,85	100	0,62

- ils produisent moins de biomasse que la souche sauvage ce qui peut s'expliquer par une augmentation significative de la production totale d'acides.
- les temps de génération diminuent de 1h 50mn pour la souche sauvage à 1h 20mn pour les mutants ; cette différence peut s'expliquer par le fait que la production d'acétate génère plus d'ATP que celle du butyrate.
- la bioconversion du glycérol en 1,3-PPD n'a pas changé. Le NADH qui n'est pas utilisé pour la biosynthèse du butyrate ne sert pas à augmenter le rendement en 1,3-PPD qui reste compris entre 0,61 et 0,63.

- L'activité 1,3-PPD déshydrogénase bien que plus faible que celle du sauvage est toujours présente ; l'activité de la glycérol déshydrogénase est également plus faible alors que celle de la diol déshydratase est constante. Les activités acétate kinase sont en particulier plus élevées que celles de la butyrate kinase.
- l'effet marquant de la mutation par l'alcool allylique est la diminution du  $K_m$  apparent pour l'aldéhyde chez les mutants et l'augmentation du  $K_m$  apparent pour l'alcool ce qui permet d'éviter l'accumulation des aldéhydes (3-HPA ou acroléine) dans la cellule.

Les mutants ont développé un mécanisme pour pouvoir résister à l'alcool allylique basé sur l'augmentation de la concentration intracellulaire de NADH et sur l'augmentation de l'affinité de la 1,3-PPD déshydrogénase pour les aldéhydes qui sont plus toxiques que les alcools.

#### *1.4.3.4.2. En culture continue*

La fermentation du glycérol en culture continue a été étudiée chez *C. butyricum* DSM 5431 sous limitation de source de carbone constituée de glycérol ou de glucose par Abbad-Andaloussi et coll (1996b).

Sur glycérol, la croissance de *C. butyricum* DSM 5431 en culture continue à différentes vitesses de croissance et sous limitation de glycérol n'affecte pas la conversion du glycérol en 1,3-propanediol (**Tableau XI**).

**Tableau XI.** Effet du taux de dilution (D) sur la croissance et la formation de produits par *Clostridium butyricum* DSM 5431 en culture continue sur glycérol (108,5 mM) d'après Abbad-Andaloussi et coll. (1996b).

D (h <sup>-1</sup> )	Glycérol utilisé (mM)	Acétate (g/L)	Butyrate (g/L)	1,3-PPD (g/L)	Acétate butyrate	Biomasse (g/L)	Rendement en 1,3-PPD
0,04	108	5,3	21,1	62	3,98	0,64	0,57
0,08	108	5,1	20,4	64,6	4,00	0,64	0,60
0,15	108	5,4	19,2	62,8	3,55	0,57	0,58
0,26	107	7,9	15,4	64,8	1,94	0,60	0,60
0,30	63	13,8	3,7	36,6	0,26	0,33	0,58

La comparaison des flux carbonés de production du 1,3-PPD et de production des acides montre que ces deux voies évoluent parallèlement quel que soit le taux de dilution étudié. En faisant varier le taux de dilution ( $D$ ) le rapport acétate/butyrate est affecté dans les deux cas :

- ❑ à faible taux de dilution ( $0,04 \text{ h}^{-1}$  à  $0,26 \text{ h}^{-1}$ ) les cellules produisent beaucoup plus de butyrate que d'acétate, le rapport acétate/butyrate est inférieur à 1.
- ❑ à un taux de dilution élevé ( $0,30 \text{ h}^{-1}$ ), les cellules produisent plus d'acétate que de butyrate. On observe une inversion du rapport acétate/butyrate qui devient supérieur à 1. Cette augmentation est corrélée avec la multiplication de l'activité spécifique de l'acétate kinase par un facteur 9 avec la stabilité de l'activité spécifique de la butyrate kinase.

Le NADH produit par la glycérol déshydrogénase et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase n'est pas suffisant pour la formation du 1,3-propanediol, puisque la quantité de 1,3-propanediol formée est plus grande que la quantité de NADH générée, ce qui suggère l'existence d'une autre source de NADH. Cette source est la réoxydation par une ferrédoxine NAD<sup>+</sup> réductase d'une partie de la ferrédoxine réduite produite par la pyruvate ferrédoxine oxydoréductase. L'activité spécifique de cette enzyme augmente avec l'augmentation de la vitesse de croissance. Le fait que des concentrations intracellulaires élevées de NADH soient trouvées signifie que l'activité glycérol déshydratase est l'étape limitante dans la formation du 1,3-propanediol ; ainsi le 3-HPA qui est un composé très toxique ne s'accumule pas.

**MATERIELS  
ET  
METHODES**

# Chapitre II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

## II.1. SOUCHES UTILISÉES

La souche bactérienne avec laquelle notre travail a été mené est *Clostridium butyricum* E5 (Petitdemange et coll., 1995), une souche isolée au laboratoire qui peut croître sur du glycérol industriel avec un très bon rendement en 1,3-propanediol (de l'ordre de 0,65 mole/mole). Elle présente une plus grande tolérance pour ce diol et pour le glycérol par rapport à la souche DSM 5431.

Nous avons aussi utilisé un mutant de cette souche, E5 MD, obtenu en utilisant la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Ce mutant a été également isolé au laboratoire et est résistant à de fortes concentrations en alcool allylique. La souche *C. butyricum* DSM 5431 isolée par Biebl et coll. (1992) à partir d'échantillons pasteurisés de boue et de terre a été également utilisée.

## II.2. MILIEUX DE CULTURE

La source carbonée généralement utilisée est le glycérol dont la concentration varie entre 10 g/L et 60 g/L. Le glucose a également servi de source carbonée avec une concentration variant selon l'étude entre 0 et 8 g/L. Le DL-glycéraldéhyde ajouté varie entre 0 et 2 mM.

### II.2.1. Milieu de Homann

Le milieu de culture de base utilisé dans ce travail est le milieu liquide décrit par Homann et coll. (1990). Ce dernier comprend :

1- Dans 800 mL d'eau :

Glycérol	60 g pour le fermenteur 20 g pour les tubes de précultures
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , anhydre	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , anhydre	0,5 g
Extrait de levure	1 g
Solution SL7 (Biebl et Pfenning, 1981)	2 mL
CaCO <sub>3</sub>	2 g (pour les tubes seulement)



2- Dans 80 mL d'eau :

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
$\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	200 mg

Le pH de cette solution est ajusté à pH 7,0, avec KOH, 1 M

3- Dans 15 mL d'eau

$\text{CaCl}_2$	15 mg
-----------------	-------

4- Dans 5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 0,1 N :

$\text{FeSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	5 mg
---------------------------------------	------

La composition de la solution SL7, pour un litre est la suivante:

$\text{ZnCl}_2$	70 mg
$\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	100 mg
$\text{BO}_3\text{H}_3$	60 mg
$\text{CoCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{CuCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$	20 mg
$\text{NiCl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$	35 mg
HCl 37 %	0,9 mL

Les quatre composantes du milieu sont autoclavées séparément à 121 °C pendant 20 minutes puis additionnées stérilement.

### II.2.2. Milieu RCM (Reinforced Clostridial Medium)

Ce milieu est obtenu sous forme déshydratée chez OXOID et est reconstitué à raison de 38 g/L dans de l'eau distillée. La composition finale pour un litre est la suivante :

Extrait de levure	3 g
Poudre « Lab-Lemco »	10 g
Peptone	10 g
Amidon	1 g
Glucose	5 g
Chlorhydrate de cystéine	0,5 g
Chlorure de sodium	5 g
Acétate de sodium	3 g
Agar	0,5 g

Le milieu est porté à ébullition pour obtenir une dissolution parfaite, et réduit sous flux d'azote en présence de résazurine. Puis il est réparti en tubes de Hungate et stérilisé 15 minutes à 121°C.

### **II.2.3. Milieu utilisé en cultures discontinues à pH régulé**

Pour les cultures discontinues en fermenteur, le milieu utilisé est celui décrit dans le paragraphe précédent, la concentration du glycérol dans le fermenteur est de 60 g/L. Le pH de ce milieu est ajusté à 7,0 avec KOH 2 N.

### **II.2.4. Milieu utilisé en cultures continues**

Pour les cultures continues en fermenteur, le milieu utilisé est celui décrit dans le paragraphe précédent (milieu Homann), la concentration du glycérol utilisée est de 10 g/L, celle du glucose est de 1, 2, 4 ou 8 g/L.

## **II.3. CONDITIONS DE CULTURE**

### **II.3.1. Cultures en tubes**

Après préparation, le milieu liquide est porté à ébullition, réparti en tubes de Hungate et dégazé à chaud sous flux d'azote pendant 15 à 30 min. Ceux-ci sont ensuite bouchés avant d'être autoclavés 20 min à 121°C.

Les inocula sont obtenus en ensemençant à 10% (v/v) des tubes de milieu RCM à partir de suspensions stocks de spores conservées à 4°C. Le tube inoculé subit un choc thermique (80°C, 10 min) afin d'éliminer les formes végétatives et d'accélérer la germination des spores.

Après incubation à 34°C pendant une nuit, la culture en phase exponentielle de croissance obtenue sert à l'inoculation des tubes de préculture.

### **II.3.2. Cultures en fermenteur**

#### ***II.3.2.1. Cultures discontinues***

Les fermentations discontinues à pH régulé ont été effectuées dans des réacteurs en verre de volume total 2 litres. Après stérilisation (45 min à 121°C), le milieu de culture est dégazé stérilement sous flux d'azote jusqu'à l'inoculation. L'ensemencement à 10% (v/v) est réalisé à partir de l'inoculum en phase exponentielle de croissance. L'homogénéisation du

milieu est assurée par agitation faible (100 rpm). La température est maintenue à 32°C par circulation d'eau thermostatée dans une double enveloppe. Le pH est mesuré avec une électrode stérilisable INGOLD et maintenu à la valeur de la consigne par un régulateur Biolafitte contrôlant l'ajout de potasse 2 N.

### ***II.3.2.2. Cultures continues***

Les cultures en continu ont été réalisées à partir de réacteurs présentant les mêmes caractéristiques que celles décrites précédemment, avec toutefois en supplément des systèmes d'adaptation utilisés pour l'apport du milieu d'alimentation et l'évacuation du milieu fermenté, permettant ainsi d'assurer de parfaites conditions de stérilité. La préparation du fermenteur et les conditions de cultures sont identiques à celles décrites précédemment.

L'alimentation en continu de la culture se fait à l'aide d'une pompe péristaltique, le volume de culture étant maintenu à 1 litre par soutirage séquentiel et effectué grâce à une régulation de niveau. Les bidons d'alimentation, de contenance 5 ou 10 litres de milieu, sont stérilisés à 121°C pendant 2 h.

L'ensemencement du fermenteur contenant initialement un milieu de culture à 60 g/L de glycérol est réalisé de façon analogue à celle décrite pour les cultures discontinues. La mise en route du système continu à faible taux de dilution débute 12 h après l'ensemencement, alors que la culture se trouve en phase exponentielle de croissance. Le pH de la culture est régulé par ajout de KOH 2N, la vitesse d'agitation est de 100 rpm pour minimiser la fixation des cellules sur les parois internes du fermenteur, la température est maintenue à 32°C par un bain-marie. Les prélèvements se font à la sortie. Après 4 temps de séjour, l'état stationnaire est atteint et la fermentation continue est suivie.

## **II.4. METHODES ANALYTIQUES**

### **II.4.1. Détermination de la concentration cellulaire**

Une méthode spectrophotométrique est utilisée pour déterminer la densité cellulaire : l'absorbance du milieu à une longueur d'onde de 600 nm est mesurée contre de l'eau avec un spectrophotomètre Beckman 34.

Une corrélation entre la densité optique et la matière sèche cellulaire a été établie.

La concentration cellulaire exprimée en g/L et la densité optique sont proportionnelles avec un facteur de corrélation de 0,3.

## II.4.2. Dosages des substrats et des produits

### II.4.2.1. Dosages par CLHP

Les substrats résiduels, glucose et glycérol, le 1,3-propanediol, l'acétate et le butyrate sont dosés par Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP), après centrifugation des échantillons du moût de fermentation pendant 15 minutes à 12 000 tr/min et filtration des surnageants sur membrane de nitrocellulose de porosité 0,2 µm.

L'ensemble chromatographique comprend :

- un dégazeur en ligne Thermo Separation Products
- une pompe isocratique et un injecteur automatique (boucle d'injection : 20µl) Spectraphysics
- une colonne de séparation par échange de cations Alltech IOA-2000 acides organiques
- une colonne Alltech Nucleosil 100 sur silice greffée C<sub>18</sub>
- une électrovanne permettant de passer rapidement d'une colonne à l'autre
- un détecteur réfractométrique Spectra-physics
- un logiciel d'intégration et de traitement des données Thermo Separation Products.

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- élution par l'acide sulfurique 0,01 N pour la colonne acides organiques ou par de l'eau Milli Q pour la colonne C 18 , à un débit de 0,5 mL/min. Les solvants sont préalablement filtrés sur des membranes nylon Whatmann 0,2 µm par un ensemble Millipore filtration/dégazage.
- température ambiante
- étalonnage externe avec des solutions de concentrations connues préparées dans le milieu de culture.

### II.4.2.2. Dosages par CPG

Les concentrations en 1,3-propanediol, acétate et butyrate ont également été déterminées par CPG (Chromatographie en Phase Gazeuse) (Intersmat IGC 121 FL) sur une colonne de Chromosorb 101 de 2 mètres de long, de diamètre interne de 2 mm, à une température de

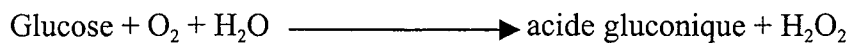
170°C. Le système comprend un détecteur à ionisation de flamme et un intégrateur Intersmat ICR 1B. L'azote est le gaz vecteur, le gaz d'ionisation est l'hydrogène mélangé à l'air comprimé. L'étalon interne est le n-butanol.

### II.4.3. Dosages par méthodes enzymatiques

#### II.4.3.1. Le glucose

La concentration en glucose résiduel est également déterminée par la méthode de la glucose oxydase. Il s'agit d'un dosage colorimétrique spécifique du glucose :

La réaction transforme le glucose en acide gluconique :

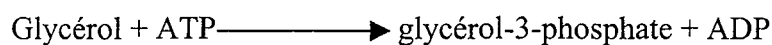


En présence de peroxydase,  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxyde l'orthodiansidine. L'absorbance est mesurée à 435 nm. Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions avec une solution de glucose de concentration connue.

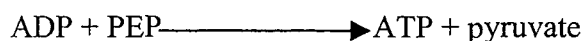
#### II.4.3.2. Le glycérol

La concentration en glycérol résiduel est déterminée enzymatiquement par kit selon la méthode Boehringer dont le principe est le suivant :

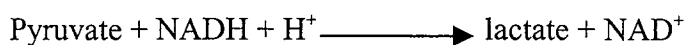
La glycérolkinase catalyse la phosphorylation du glycérol en G3P par l'ATP :



L'ADP formé est à nouveau transformé en ATP par le phosphoénol-pyruvate (PEP) en présence de pyruvate kinase avec formation de pyruvate :



Le pyruvate est réduit en lactate par le NADH en présence de lactate déshydrogénase :



La quantité de  $\text{NAD}^+$  formé durant la réaction est proportionnelle à la quantité de glycérol présent. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à 340 nm.

### *II.4.3.3. Le glycéraldéhyde*

Le DL-glycéraldéhyde est dosé par la méthode au MBTH (3-méthyl-benzothiazolinonehydrazone) (Toraya et coll., 1977).

A 500  $\mu$ L d'une solution de DL-glycéraldéhyde sont ajoutés :

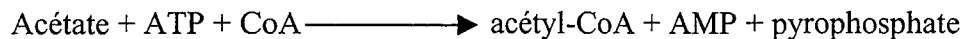
- 0,5 mL de tampon citrate 100 mM, pH 3,6
- 0,25 mL de 3-méthyl-2benzo thiazolinone hydrazone (MBTH, à 0,1%)

La réaction chimique entre le MBTH et l'aldéhyde s'effectue pendant 15 min à 34°C, ensuite 0,5 mL d'eau sont ajoutés. Les DO sont alors lues à 305 nm contre un blanc.

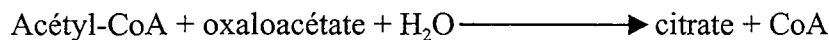
### *II.4.3.4. L'acétate*

L'acétate est aussi dosé enzymatiquement avec un kit selon la méthode Boehringer :

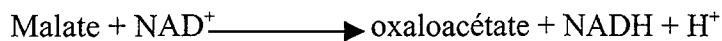
L'acide acétique est transformé en acétyl-CoA par l'acétyl-CoA-synthétase en présence d'ATP et du coenzyme A :



La citrate synthase catalyse la réaction entre l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate pour donner le citrate :



L'oxaloacétate nécessaire dans cette réaction est obtenu par oxydation du malate par la malate déshydrogénase en présence de  $\text{NAD}^+$  :



Le dosage repose sur la formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm. La quantité de NADH formé n'est pas directement proportionnelle à la concentration en acétate car la réaction indicatrice précède la réaction proprement dite.

## **II.5. DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES**

### **II.5.1. Préparation des extraits acellulaires**

Les cellules sont resuspendues dans du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) préalablement réduit sous flux d'azote et contenant 2 mM de dithiothréitol et 1 mM de  $MnCl_2$ . Elles sont alors soniquées à 2°C pendant 20 secondes à une fréquence de 20 Khz, suivi d'une pause de 60 secondes (MSE, 150 Watt ultrasonic desintegrator). Ce cycle est répété 4 fois.

Le surnageant est récupéré après une centrifugation de 20 minutes à 12 000 g, dégazé sous vide puis le vide est cassé sous azote.

L'oxygène pouvant nuire à certaines activités, toutes ces étapes doivent être réalisées en anaérobiose, sous azote.

### **II.5.2. Détermination des activités enzymatiques spécifiques**

#### ***II.5.2.1. Dosage de la concentration en protéines***

Les concentrations protéiques des extraits acellulaires sont estimées par dosage colorimétrique. Pour cela, on utilise deux méthodes :

(1) La méthode de Lowry et coll (1951) :

Elle repose sur une coloration finale résultant de la réaction colorée du Biuret qui s'établit en milieu alcalin entre le sulfate de cuivre et les liaisons peptiques. Elle est rendue plus sensible par la réduction du réactif phosphomolybdo-phosphotungstique ou réactif de Folin-Ciocalteu avec la tyrosine et le tryptophane présents dans les protéines traitées.

(2) La méthode de Bradford (1976) :

Cette méthode est basée sur le fait que l'absorbance maximum de bleu de Coomassie en solution acide passe de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu) après fixation sur les protéines.

Une courbe étalon est réalisée dans les deux cas avec une solution de serum albumine bovine (SAB) de concentration connue qui permet d'estimer la concentration de protéines de l'extrait.

#### ***II.5.2.2. Glycérol ou 1,3-propanediol déshydrogénases***

Les activités de ces enzymes sont mesurées, à 37°C, par augmentation au cours du temps de la densité optique à 340 nm due à la production du NADH (Ruch et coll., 1974).

L'activité est déclenchée par ajout de l'extrait brut.

Le milieu réactionnel (1 mL) contient :

- Tampon bicarbonate de potassium pH 9                      100 mM
- $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$                                                               30 mM
- $\text{NAD}^+$                                                                               2 mM
- Glycérol ou 1,3-Propanediol                                      100 mM

On calcule l'activité spécifique exprimée en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines selon la formule :

$$AS = \frac{\Delta DO \times L \times V \times 1000}{\epsilon \cdot L \cdot t \cdot v \cdot P}$$

V : volume réactionnel final (en mL)

v : volume de la prise d'essai ( en mL)

$\epsilon$ :  $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour le NADH

L : longueur du trajet optique de la cuve (1 cm)

t : temps durant lequel est prise la variation de DO (min)

P : concentration protéique (mg/mL)

### ***II.5.2.3. Glycérol déshydratase***

Le dosage de la glycérol déshydratase est effectué par la méthode de Toraya et coll. (1977). Le milieu réactionnel contient :

- Tampon phosphate de potassium pH 7                      35 mM
- 1,2-propanediol                                                              200 mM
- KCl                                                                                      50 mM
- Coenzyme B12                                                                      15  $\mu\text{M}$

La réaction est initiée par l'ajout de l'extrait brut dans le milieu.

Après une incubation de 10 minutes à  $34^\circ\text{C}$ , la réaction est stoppée par ajout de :

- 0,5 mL de tampon citrate 100 mM, pH 3,6
- 0,25 mL de 3-méthyl-2-benzo thiazolinone hydrazone (MBTH) à 0,1% (p/v).

La réaction chimique entre le MBTH et l'aldéhyde formé s'effectue pendant 15 min à  $34^\circ\text{C}$ .

Elle est ensuite stoppée par ajout de 0,5 mL d'eau.

Les essais sont ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 2 minutes.

Les DO des surnageants sont lues à 305 nm contre un blanc (milieu réactionnel sans extrait).



Le calcul de l'activité spécifique est le même que précédemment, avec  $\varepsilon = 13,3.10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour le MBTH.

#### ***II.5.2.4. Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase***

Le milieu réactionnel (1mL) contient (Ferdinand, 1964) :

- Tampon Ferdinand ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, EDTA 0,2 mM, triéthanolamine 40 mM, pH 8,9)
- D-glycéraldéhyde-3-phosphate 1 mM
- $\text{NAD}^+$  1 mM

La réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout de l'extrait enzymatique.

L'activité est suivie par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm du fait de la réduction du  $\text{NAD}^+$  par l'activité GAPDH.

Le calcul de l'activité spécifique est le même que précédemment, avec  $\varepsilon = 6,22.10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour le NADH.

NB: Tous les milieux réactionnels précédents sont préalablement dégazés sous vide et le vide est cassé sous flux d'azote afin de conserver de bonnes conditions d'anaérobiose.

#### ***II.5.2.5. Hydrogénase***

L'hydrogénase est dosée dans le sens de consommation de l'hydrogène. Le milieu réactionnel (1mL) contient (Junelles et coll., 1988) :

- Tampon phosphate de potassium pH 7,2 60 mM
- Méthyl viologène 20 mM
- $\beta$  mercaptoéthanol 140 mM

Les cuves sont dégazées sous vide puis le vide est cassé sous flux d'hydrogène qui sert de substrat. La réaction est déclenchée par ajout de l'extrait. La réduction du méthyl viologène est suivie à 560 nm. Le calcul est le même que précédemment avec  $\varepsilon = 7,41.10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour le méthyl viologène.

### ***II.5.2.6. Acétate et butyrate kinase***

Ces deux activités ne sont pas mesurées en conditions anaérobies. Elles sont déterminées en mesurant le taux d'acétyl-phosphate produit par la méthode de Lipmann et Tuttle (1945) à 540 nm.

Le milieu réactionnel contient :

- Tampon Tris-HCl pH 7,5 100 mM
- Acétate de potassium ou butyrate de potassium 40 mM
- Sulfate de manganèse 6 mM
- ATP 10 mM

La réaction est initiée par l'ajout de l'extrait acellulaire.

Après une incubation de 5 minutes à 37°C, on ajoute 200 µL de NH<sub>2</sub>OH, 700 mM, pH 6,4, neutralisé extemporanément avec NaOH 4M.

On laisse incuber pendant 5 minutes à température ambiante, puis on ajoute dans l'ordre : TCA, 15%, HCl, 4 M et FeCl<sub>3</sub>, 5%.

Les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 5 minutes. Les DO des surnageants sont alors lues à 540 nm contre un blanc.

Une gamme étalon est réalisée avec différents volumes d'une solution d'acétyl-phosphate, de concentration 10 mM, qui est le produit de la réaction enzymatique.

## **II.6. DETERMINATION DES CONCENTRATIONS EN NUCLEOTIDES**

La détermination des niveaux des nucléotides a été réalisée par dosages fluorimétriques des quantités de NADH formé ou consommé lors de réactions enzymatiques impliquant ces cofacteurs à l'aide de protocoles mis au point par Vasconcelos et coll. (1994).

Le fluorimètre utilisé est un modèle HITACHI F-2000.

Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de fluorescence de NADH ont été fixées respectivement à 341 nm et 459 nm.

Des gammes étalons ont été élaborées, dans les mêmes conditions opératoires, pour des concentrations de NADH comprises entre 1 et 12 nM.

## II.6.1. Dosage du NAD<sup>+</sup> intracellulaire

### II.6.1.1. Extraction

10 mL de culture sont prélevés du réacteur et immédiatement transférés dans un tube contenant 500  $\mu$ L de HCl 3 M en maintenant une vive agitation à l'aide d'un barreau magnétique. Le NAD<sup>+</sup> est alors extrait et les molécules de NADH et NADPH sont détruites (Wimpenny et Firth, 1972).

Le pH doit être homogène et compris entre 1,4 et 1,7.

Après incubation à 50°C pendant 5 minutes, le pH est ramené à 7 par ajout de faibles quantités de KOH 1 M toujours sous agitation afin d'éviter des concentrations locales trop élevées pouvant dégrader le NAD<sup>+</sup>. Le mélange est centrifugé 10 minutes à 3 000 g et à 4°C puis le surnageant est prélevé et stocké à -80°C, jusqu'à dosage.

### II.6.1.2. Dosage du NAD<sup>+</sup>

Le principe du dosage est basé sur l'augmentation de fluorescence liée à la réduction du NAD<sup>+</sup> par une alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1) de levure NAD<sup>+</sup>-dépendante (Klingenberg, 1965 ; Vasconcelos et coll., 1994) selon la réaction :



Le milieu réactionnel contient (en concentration finales) :

- Tampon pyrophosphate pH 8,8                      50 mM  
  + 2,5 g/L de semi-carbazide
- Ethanol                                                      100 mM

0,45 mL d'extrait à doser sont ajoutés pour amener le volume final réactionnel à 1 mL.

La fluorescence est mesurée avant et après l'addition de 10 UI d'alcool déshydrogénase.

La différence observée correspond à la quantité de NADH produit.

On peut alors calculer la concentration en NADH, correspondant à la concentration intracellulaire en NAD<sup>+</sup> et exprimée en  $\mu$ moles/g de matière sèche.

## II.6.2. Dosage du NADH intracellulaire

### II.6.2.1. Extraction

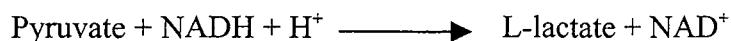
Un échantillon de 10 mL de culture est prélevé et immédiatement transféré dans un tube contenant 250  $\mu$ L de KOH 3 M. Une vive agitation permet une extraction rapide du NADH et une bonne homogénéisation du pH, compris entre 12 et 12,5.

Le NADH est extrait avec l'hydroxyde de potassium. Le NAD<sup>+</sup> et le NADP<sup>+</sup> présents dans le mélange sont ainsi détruits (Wimpenny et Firth, 1972).

Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, une centrifugation à 3 000 g pendant 10 minutes et à 4°C permet de récupérer l'extrait qui est congelé à -80°C jusqu'au dosage.

### II.6.2.2. Dosage du NADH

En présence de pyruvate, l'oxydation du NADH par la L-lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27) entraîne une diminution de fluorescence (Klingenberg, 1965) selon la réaction :



Le milieu réactionnel contient (en concentrations finales) :

- Tampon triéthanolamine, pH 6      100 mM
- MgSO<sub>4</sub>      3 mM
- EDTA      0,9 mM
- Pyruvate      2 mM

0,5 mL d'extrait à doser sont ajoutés pour amener le volume final réactionnel à 1 mL.

L'oxydation du NADH est déclenchée par l'ajout de 2  $\mu$ L de lactate déshydrogénase soit 10 UI.

La fluorescence est mesurée avant et après addition de l'enzyme, la différence observée correspond à la quantité de NADH oxydé.

La concentration en NADH intracellulaire est ensuite calculée en  $\mu$ moles /g de matière sèche.

## II.6.3. Dosage de l'acétyl-CoA

### II.6.3.1. Extraction

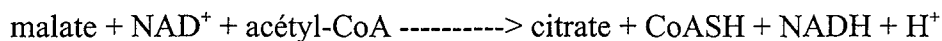
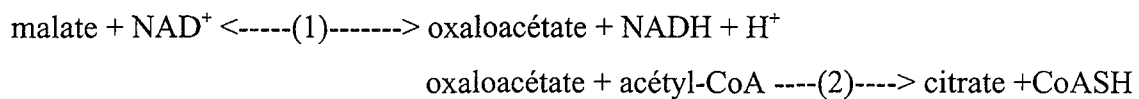
L'extraction est effectuée selon la méthode de Decker (1965). A un prélèvement de 4 mL de culture est ajouté un volume égal d'acide perchlorique (4N). Après 3 minutes, la solution est neutralisée en deux étapes:

- par ajout de KOH (8N), sous agitation, jusqu'à pH 7,0
- par ajout de KHCO<sub>3</sub> (1N) jusqu'à obtention d'un pH compris entre 6,3 et 6,7.

Une centrifugation de 10 minutes à 12 000 g précipite les protéines et le perchlorate de potassium. Le surnageant sert au dosage.

### II.6.3.2. Dosage de l'acétyl-CoA par spectrophotométrie

Le dosage se fait par le biais de la méthode décrite par Tubbs et Garland (1969), qui utilise deux réactions couplées catalysées respectivement par la malate déshydrogénase et la citrate synthétase:



Le milieu réactionnel de 2,0 mL contient Tris-HCl 1M (pH 7,8), NAD<sup>+</sup> 10 mM, L-malate 1M et 1,65 mL d'extrait.

- La première DO, E<sub>0</sub>, est alors lue à 340 nm.
  - 5 µL de malate déshydrogénase (EC 1.1.1.37) sont ajoutés.
  - Quand l'équilibre de la réaction est atteint, on lit E<sub>1</sub>.
- 5 µL de la citrate synthase (EC 4.1.3.7) sont ajoutés, et la DO E<sub>2</sub> est mesurée après déplacement de l'équilibre par la présence d'acétyl-CoA.

## II.7. PURIFICATION DES 1,3-PROPANEDIOL ET GLYCEROL DESHYDROGENASES

### II.7.1. Préparation de l'extrait brut

Les cellules se développant sur glycérol 10 g/L en culture continu sont centrifugées à 12 000 g pendant 15 minutes, puis lavées avec du tampon phosphate de potassium 20 mM (KPB, pH 7,4) préalablement réduit sous flux d'azote et contenant du dithiothréitol 2 mM et du  $MnCl_2$  1 mM puis resuspendues dans le même tampon. Elles sont alors soniquées à 2°C pendant 20 secondes à une fréquence de 20 khz, suivi d'une pause de 60 secondes. Ce cycle est répété 4 fois. Le surnageant est récupéré après centrifugation de 20 minutes à 12 000 g et à 4°C, dégazé sous vide, le vide étant ensuite cassé sous azote. L'oxygène pouvant nuire à certaines activités, toutes ces étapes doivent être réalisées en anaérobiose, sous azote.

La concentration en protéines de l'extrait acellulaire est déterminée par la méthode de Bradford (1976) en utilisant la sérum albumine bovine comme standard.

### II.7.2. Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions

#### II.7.2.1. Principe

La chromatographie par échange d'anions Q Sepharose est une chromatographie en phase liquide où la phase stationnaire de la colonne (BioRad) est constituée par une trame insoluble dans l'eau, sur laquelle sont greffés des groupements fonctionnels ionisables ( $-N^+(CH_3)_3$ ). Ces groupements ont une charge nette positive quand ils sont ionisés et peuvent donc fixer et échanger des anions.

Cette méthode chromatographique permet la séparation des molécules en fonction de leurs charges. Toutes les protéines dont le point isoélectrique est inférieur au pH utilisé, sont chargées négativement et sont adsorbées sur la matrice. Un gradient de force ionique croissante est ensuite utilisé pour éluer les protéines.

#### II.7.2.2. Protocole

L'extrait acellulaire de *C. butyricum* est déposé sur 3 colonnes préconditionnées Econo-Pac Q de 5 mL montées en séries afin de supporter des charges protéiques importantes. Elles sont connectées au système de chromatographie à faible pression de Bio-Rad.

Les colonnes sont en premier lieu équilibrées, puis lavées avec 45 mL de tampon phosphate de potassium 20 mM, pH 7,4 (tampon A), préalablement réduit sous flux d'azote et contenant

du  $\text{MnCl}_2$  1 mM et du dithiothréitol 2 mM. Les protéines adsorbées sont ensuite éluées avec le tampon B (tampon A contenant 1 M KCl) en utilisant un gradient linéaire de KCl 0 à 1 M (débit, 1 mL/min). Les fractions de 4 mL sont récupérées grâce à un collecteur automatique (Model 2110 Fraction collector Bio-Rad) et l'activité 1,3-propanediol déshydrogénase est immédiatement dosée. L'absorbance à 280 nm est suivie en continu grâce à un enregistreur SERVOGOR 120.

Toutes les opérations sont menées en chambre froide à 4°C.

### **II.7.3. Ultrafiltration**

#### ***II.7.3.1. Principe***

L'ultrafiltration permet à la fois de concentrer des solutions de macromolécules et d'éliminer la plupart des contaminants de petite masse moléculaire. Elle s'effectue sous pression d'azote, au travers d'une membrane de porosité inférieure à la taille des protéines devant être concentrées.

#### ***II.7.3.2. Protocole***

L'extrait protéique partiellement purifié est déposé dans une cellule d'ultrafiltration contenant une membrane PM 20 (Amicon) laissant passer les macromolécules dont la masse moléculaire est inférieure à 20 000 Da. La filtration sous pression permet d'obtenir la solution concentrée sur la partie supérieure de la membrane, débarrassée des petites molécules. Cette solution est déposée sur une colonne de filtration sur gel.

### **II.7.4. Chromatographie sur colonne de filtration sur gel**

#### ***II.7.4.1. Principe***

La phase stationnaire (Prepacked SE-1000/17, BioRad) est constituée d'un gel qui se comporte comme un véritable tamis vis-à-vis des molécules ayant des masses et des structures différentes. Ainsi les très grosses molécules ( $MM > 10^6$  Da) sont exclues et sortent en premier dans le volume mort de la colonne. Les plus petites molécules entrent dans les mailles du gel et se déplacent plus lentement ; à la limite, les très petites molécules ( $MM < 10^4$  Da) diffusent librement et leur volume d'élution est égal au volume total de la colonne. Cette chromatographie permet de purifier mais également de déterminer la masse moléculaire (MM) de la protéine native grâce à l'utilisation de protéines de MM connue.

#### ***II.7.4.2. Protocole***

Une partie de l'enzyme éluée par Q-sepharose puis ultrafiltrée est déposée sur une colonne à haute résolution Superose 12 HR 10/30, connectée à un système de chromatographie FPLC. La colonne est équilibrée avec le tampon KPB, 50 mM (pH 7,4) contenant KCl 100 mM et DTT 2 mM et élué à un débit constant de 0,5 mL/min . Les fractions actives sont éluées avec le même tampon après le pic d'exclusion et utilisées pour la caractérisation de l'enzyme.

#### **II.7.5. Détermination de la masse molaire de l'enzyme native**

La masse molaire de l'enzyme native est estimée par filtration sur gel sur une colonne de Superose 12 HR 10/30 équilibrée sous un débit constant de 0,5 mL/min avec un tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 contenant KCl 100 mM.

La colonne est calibrée avec des protéines standard de masse moléculaire connue (Sigma) : bleu dextran (2 000 000 Da), apoferritin (443 000 Da), alcool déshydrogénase (150 000 Da), serum albumine humain (150 000 Da), carbonic anhydrase (29 000 Da), cytochrome C (12 400 Da).

#### **II.7.6. Séparation électrophorétique en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)**

##### ***II.7.6.1. Principe***

Dans le cas des électrophorèses en conditions dénaturantes, l'analyse des macromolécules est réalisée sur gels de polyacrylamide en présence de détergent anionique SDS qui assure la dissociation des protéines multimériques et qui minimise leurs agrégations. Avant leur dépôt sur gel, les protéines sont dénaturées par addition de SDS, d'un agent réducteur à forte concentration ( $\beta$  mercaptoéthanol) puis par choc thermique à 95°C. Les polypeptides dénaturés fixent le SDS et deviennent chargés négativement ; comme la quantité de SDS fixé est proportionnelle à la masse moléculaire des polypeptides et indépendante de leur séquence, les complexes polypeptides-SDS migrent à travers le gel en fonction de leur seule masse moléculaire.



### ***II.7.6.2. Protocole***

La masse moléculaire de la sous unité enzymatique est estimée par électrophorèse, en conditions dénaturantes, de la fraction protéique active issue de la filtration sur gel. L'électrophorèse est réalisée sur gels verticaux, en plaques de 115x73x1 mm et 115x82x1 mm, dans une cuve BIORAD PROTEAN. L'électrophorèse est effectuée sur un gel discontinu d'acrylamide (Laemmli, 1970) dont le taux d'agents réticulants (bis-acrylamide) est de 2,6%. La concentration en acrylamide-bisacrylamide utilisée est de 4% pour le gel de concentration et de 12% pour le gel de séparation (**Tableau 1**). Le gel à 12 % permet la séparation des protéines de masses moléculaires comprises entre 14 500 et 200 000 Da.

Les échantillons sont dilués 2 fois dans le tampon de dépôt (**Tableau 2**) et placés à 95°C pendant 4 minutes.

La migration des protéines se fait sous un voltage constant de 200 volts pendant 45 minutes et à température ambiante dans un tampon Tris/Glycine pH 8,3 (**Tableau 3**).

Les protéines suivantes ont servi de marqueurs de masse moléculaire : conalbumine (76 000 Da), serum albumine bovine (66 200 Da), actine (43 000 Da), GAPDH (36 000 Da), carbonic anhydrase (31 000 Da), inhibiteur trypsique (21 500 Da), myoglobine (17 500 Da).

Les bandes protéiques sont localisées par deux méthodes de coloration :

#### **1) Coloration au bleu de Coomassie**

Le gel est coloré avec une solution de bleu de brillant de Coomassie R-250 (0,1%) dans un mélange méthanol/acide acétique/eau (4:1:5, v/v), pendant 30 min puis décoloré avec une solution méthanol/acide acétique/eau (4:1:5, v/v).

#### **2) Coloration au nitrate d'argent (silver stain)**

##### **✓ Principe**

La coloration au nitrate d'argent est une méthode simple utilisée pour la détection des protéines ou des acides nucléiques après électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Cette méthode est 30 à 50 fois plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie et elle permet de détecter des quantités protéiques de l'ordre du nanogramme.

## ✓ Protocole

### A. Etape de fixation

Après électrophorèse, le gel est placé dans la solution de fixation sous agitation pendant 20 minutes.

La solution de fixation est préparée et contient:

<input type="checkbox"/>	Reagent grade methanol	200 mL	50% v/v
<input type="checkbox"/>	Reagent grade acide acétique	40 mL	10% v/v
<input type="checkbox"/>	Fixative enhancer concentrate	40 mL	10% v/v
<input type="checkbox"/>	Eau milli Q	120 mL	30% v/v

### B. Etape de lavage

Le lavage du gel est réalisé de la manière suivante:

- Enlever la solution de fixation
- Rincer le gel dans 400 mL d'eau milli Q pendant 10 mn sous agitation
- Enlever l'eau
- Rincer une autre fois avec 400 mL d'eau milli Q pendant 10 mn.

### C. Etape de coloration et de développement

Le gel est coloré avec une solution de coloration pendant 20 minutes qui est préparée 5 min avant. Après obtention d'une coloration désirée, le gel est placé dans une solution d'acide acétique 5% pour stopper la réaction.

La solution de coloration contient:

<input type="checkbox"/>	Eau milli Q	35 mL
<input type="checkbox"/>	Silver complex solution	5 mL
<input type="checkbox"/>	Reduction moderator solution	5 mL
<input type="checkbox"/>	Image development reagent	5 mL
<input type="checkbox"/>	Development accelerator solution	50 mL

### D. Etape de décoloration

La décoloration est réalisée de la manière suivante:

- Placer le gel dans 400 mL d'acide acétique 5% pendant 15 mn
- Tremper le gel dans 400 mL d'eau milli Q pendant 5 mn

Une fois que la coloration du gel est réalisée, le gel est séché dans un appareil GEL DRYER MODEL 543 sous vide à une température de 80°C pendant 2 heures.

**Tableau 1. Composition des gels de concentration et de séparation.**

	<b>GEL DE CONCENTRATION</b>	<b>GEL DE SEPARATION</b>
	<b>4%</b>	<b>12%</b>
Eau distillée	6,1 mL	3,5 mL
Tris-HCl 0,5 mol/l, pH 6,8	2,5 mL	
Tris-HCl 1,5 mol/l, pH 8,8		2,5 mL
SDS 10% (p/v)	0,1 mL	0,1 mL
Acrylamide/bis (30%)	1,3 mL	4,0 mL
Persulfate d'ammonium (10%)	0,05 mL	0,05 mL
TEMED	0,01 mL	0,005 mL

**Tableau 2. Composition du tampon de dépôt.**

<b>PRODUITS</b>	<b>VOLUMES (mL)</b>
Eau distillée	4,0
Tris-HCl 0,5 mol/l, pH 6,8	1,0
Glycérol	0,8
SDS 10% (p/v)	1,6
2- $\beta$ -mercaptoéthanol	0,4
Bleu de bromophénol 0,05% (p/v)	0,2

**Tableau 3. Composition du tampon de migration (5X).**

<b>PRODUITS</b>	<b>CONCENTRATIONS (g/L)</b>
Tris base	15
Glycine	72
SDS	5

Le pH est ajusté à 8,3

## **II.7.7. Détermination de la séquence NH<sub>2</sub>-terminal de la 1,3-propanediol déshydrogénase**

Cette analyse a été réalisée par le Laboratoire de Microséquençage des Protéines de l'Université Henri Poincaré (Nancy, France).

Après électrophorèse en conditions dénaturantes de l'enzyme purifiée et transfert sur membrane PVDF(Prosorb), l'analyse de la séquence d'acides aminés a été réalisée sur un microséquençeur 476A (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) avec l'identification en ligne des dérivés de phenylthiohydantoïne.

## **II.7.8. Caractérisation des 1,3-propanediol et glycérol déshydrogénases**

### ***II.7.8.1. Détermination du pH optimum***

Les essais pour déterminer le pH optimum ont été réalisés avec le tampon KPB 0,2 M ajusté sur des valeurs appropriées de pH avec du KOH 3 M et du HCl 3 M. Le DL-glycéraldéhyde (DL-Gld) 10 mM, le dihydroxyacétone (DHA) 10 mM et le 3-HPA 3,5 mM ont été réduits en présence de NADH, 0,37 mM. Le 1,3-PPD et le glycérol sont oxydés en présence de NAD<sup>+</sup>, 2 mM (100 mM de 1,3-PPD et glycérol sont utilisés). Les valeurs du pH optimum ont été calculées par régression linéaire de l'équation à double pKa en forme de cloche en utilisant le logiciel Grafit.

### ***II.7.8.2. Détermination des paramètres cinétiques***

Les valeurs du K<sub>m</sub> apparent des substrats et coenzymes sont déterminées à 37°C avec du tampon carbonate de potassium (pH 9,7 pour la réaction d'oxydation et pH 9,1 pour la réaction de réduction). Elles sont déterminées à partir des résultats des expériences dans lesquelles une concentration fixe d'un autre réactif est utilisée. La valeur du K<sub>m</sub> est exprimée en mM et calculée par régression non linéaire de l'équation de Michaelis Menten en utilisant le logiciel Grafit.

### ***II.7.8.3. Détermination de la spécificité de substrat***

Les activités des réactions d'oxydation catalysées par la 1,3-PPD déshydrogénase et la glycérol déshydrogénase sont déterminées à 37°C, par augmentation au cours du temps de la densité optique à 340 nm due à la production du NADH.

Le milieu réactionnel (1 mL) contient:

- Tampon carbonate de potassium pH 9,7 100 mM
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  30 mM
- $\text{NAD}^+$  2 mM
- Substrat 100 mM

Les activités sont exprimées relativement à celles obtenues avec le 1,3-PPD ou le glycérol.

Les activités des réactions de réduction sont déterminées sous les mêmes conditions que celles décrites pour les réactions d'oxydation, à l'exception du milieu réactionnel (1mL) qui contient:

- Tampon carbonate de potassium pH 9,1 100 mM
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  30 mM
- NADH 0,37 mM
- Substrat 100 mM

Les activités sont exprimées relativement à celles obtenues avec le 3-HPA.

#### ***II.7.8.4. Détermination de l'effet des cations divalents***

Pour déterminer l'effet de ces cations sur les activités 1,3-PPD et glycérol déshydrogénases, les sels de chlorure d'ammonium, sodium, potassium, magnésium, ou lithium (10 mM) et du fer, manganèse, ou calcium (1 mM) sont ajoutés à un mélange réactionnel contenant:

- Tampon carbonate de potassium pH 9,0 100 mM
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  30 mM
- $\text{NAD}^+$  2 mM
- 1,3-PPD ou glycérol 100 mM

**RESULTATS  
ET  
DISCUSSION**

# Chapitre III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

## Partie 1. INFLUENCE DE L'AJOUT D'UN CO-SUBSTRAT DE LA 1,3-PROPANEDIOL DESHYDROGENASE SUR L'UTILISATION DU GLYCEROL PAR *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* DSM 5431

---

### 1. INTRODUCTION

*Clostridium butyricum*, bactérie anaérobie stricte, habituellement métabolise le glycérol en 1,3-propanediol, acétate, butyrate, dioxyde de carbone et hydrogène moléculaire.

La fermentation du glycérol chez *C. butyricum* peut s'opérer suivant 2 voies :

- la première permet la production du 1,3-propanediol via le 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA)
- la seconde permet la production de l'acide acétique et de l'acide butyrique via le glycéraldéhyde-3-phosphate.

Abbad-Andaloussi et coll. (1996b) ont montré que l'évolution de la croissance de *C. butyricum* DSM 5431, en fonction de différents taux de dilution (D), n'affecte pas le taux de conversion du glycérol en 1,3-PPD. La comparaison des flux carbonés de production du 1,3-PPD et de production des acides montre que ces deux voies évoluent parallèlement quel que soit le taux de dilution étudié. Cependant la croissance de cette bactérie ralentit à partir d'un taux de dilution égal à  $0,30 \text{ h}^{-1}$ , conditions qui entraînent une limitation en carbone.

Ainsi la croissance de *C. butyricum* DSM 5431 sur glycérol dans ces conditions conduit entre autres (par comparaison avec des taux de dilution allant de  $0,04$  à  $0,26 \text{ h}^{-1}$ ) à :

- une diminution de la biomasse de l'ordre de 50%
- une diminution de l'utilisation du glycérol de l'ordre de 58%
- une inversion du rapport acétate/butyrate qui devient supérieur à 1.

Cette inversion s'explique principalement par la diminution de la production du butyrate ce qui limite l'utilisation des deux molécules de NADH, et explique ainsi l'augmentation de la concentration intracellulaire de ce composé.

La voie majeure de régénération du  $\text{NAD}^+$  qui est alors la voie de production du 1,3-PPD ne permet plus l'oxydation du NADH par la 1,3-PPD déshydrogénase. Cette oxydation est liée à la production du 3-HPA par la glycérol déshydratase. Le fait qu'à un taux de dilution élevé, la

concentration intracellulaire du NADH soit très élevée démontre que la production du 3-HPA par la glycérol déshydratase est l'étape limitante de la production du 1,3-PPD. Ceci permet à *C. butyricum* d'éviter l'accumulation du 3-HPA, produit toxique et très réactif.

L'addition de co-substrats moins toxiques que le 3-HPA pouvant être réduits par la 1,3-PPD déshydrogénase a été envisagée afin de lever cette étape limitante de la fermentation.

Une première expérience a été réalisée par Abbad-Andaloussi et coll. (1996c) en présence d'un co-substrat, le propionaldéhyde, un autre substrat de la 1,3-PPD déshydrogénase. L'ajout de propionaldéhyde dans le milieu de culture entraîne une augmentation de l'utilisation du glycérol, de la formation de biomasse et des produits de biosynthèse.

Nous avons réalisé lors de notre travail une seconde expérience en présence d'un autre co-substrat, le DL-glycéraldéhyde (DL-Gld), qui peut agir comme substrat de la 1,3-PPD déshydrogénase (Daniel et coll., 1995a). Ainsi nous pourrions comparer l'action des deux co-substrats sur *C. butyricum* cultivé sur glycérol.

Notre but est de suivre l'évolution de l'utilisation du glycérol par *C. butyricum* DSM 5431 en présence de glycéraldéhyde et d'en étudier les conséquences sur le flux carboné, les concentrations intracellulaires des nucléotides, les activités enzymatiques et la croissance de cette bactérie en culture continue.



## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Nous avons utilisé dans notre travail sauf indication contraire les conditions suivantes: culture continue à  $D = 0,30h^{-1}$ , avec une concentration de glycérol égale à 108 mM. Ces conditions génèrent une limitation en carbone et des concentrations en NADH et un rapport NADH/NAD<sup>+</sup> élevés (Abbad-Andaloussi et coll., 1996b).

### 2.1. Utilisation du glycéraldéhyde par la 1,3-propanediol déshydrogénase

Daniel et coll (1995a) ont montré que le glycéraldéhyde est un substrat de la 1,3-propanediol déshydrogénase purifiée chez *Citrobacter freundii* cultivé sur glycérol avec une activité égale à 25% de celle obtenue avec le 3-HPA comme substrat.

La réaction de transformation du glycéraldéhyde par la 1,3-propanediol déshydrogénase est la suivante:



Dans un premier temps nous avons vérifié qu'il en était de même chez *C. butyricum* DSM 5431 en déterminant les  $K_m$  apparents de l'enzyme pour le glycéraldéhyde, le 1,3-propanediol, NAD<sup>+</sup> et NADH. La détermination de ces valeurs a été réalisée en ajoutant différentes concentrations de l'un des deux substrats à un milieu réactionnel strictement identique. Celui-ci est additionné d'un volume précis de l'extrait acellulaire contenant l'enzyme et une concentration saturante de l'autre substrat.

Le **tableau 1** indique que les  $K_m$  apparents pour le NAD<sup>+</sup> et le NADH sont du même ordre de grandeur alors que celui pour le glycéraldéhyde est environ 20 fois plus élevé que pour le 1,3-PPD, ce qui dénote une plus forte affinité de l'enzyme pour le 1,3-PPD que pour le glycéraldéhyde. Ces derniers résultats sont différents des valeurs obtenues ultérieurement avec le 3-HPA comme substrat de l'enzyme purifiée chez *C. butyricum* E5. Dans ce cas le  $K_m$  apparent de la 1,3-PPD déshydrogénase pour le 3-HPA et le DL-Gld et le 1,3-PPD sont de 0,17, 1,18 et 3,55 mM respectivement (Malaoui et Marczak, 2000).

Puisque le glycéraldéhyde est aussi un substrat de la 1,3-propanediol déshydrogénase il est préférable de l'utiliser à la place du 3-HPA comme co-substrat durant la croissance de cette souche sur glycérol puisqu'il est moins toxique.

**Tableau 1** : Détermination des valeurs de  $K_m$  apparents pour les substrats et les coenzymes de la 1,3-propanediol déshydrogenase de *C. butyricum* DSM 5431 cultivé en continu à un taux de dilution de  $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$  sur glycérol 108 mM.

Substrat ou Coenzyme	autre réactant	$K_m$ (mM)
1,3-PPD	2 mM $\text{NAD}^+$	3,76 (0,76)
$\text{NAD}^+$	100 mM 1,3-PPD	0,36 (0,07)
GLD	0,7 mM $\text{NADH}$	75,91 (23,15)
$\text{NADH}$	500 mM GLD	0,23 (0,03)

GLD = glycéraldéhyde

1,3-PPD = 1,3-propanediol

Les valeurs entre parenthèse sont des moyennes ( $\pm$  S.D.) de quatre expériences différentes.

## 2.2. Influence de la nature du co-substrat ajouté sur les paramètres fermentaires

Le **tableau 2** présente les résultats de l'effet de l'ajout de concentrations croissantes de glycéraldéhyde sur les paramètres fermentaires de *C. butyricum* DSM 5431 cultivé sur glycérol (108 mM) à un fort taux de dilution ( $0,30 \text{ h}^{-1}$ ).

On peut envisager deux cas:

### 2.2.1. En absence de co-substrat:

A fort taux de dilution et en absence de co-substrat, il y a une limitation de carbone puisqu'on constate :

- Une faible biomasse.
- Une utilisation incomplète du glycérol (63%).
- Une production limitée des acides avec plus d'acide acétique que de butyrate (acétate/butyrate  $> 1$ ).
- Un faible rendement en 1,3-PPD.

Ces résultats confirment les résultats précédents d'Abbad-Andaloussi et coll (1996b) qui ont cultivé en continu *C. butyricum* DSM 5431 sur glycérol seul en absence de co-substrats à différents taux de dilution (D). Ils ont trouvé que seul un D élevé ( $0,30 \text{ h}^{-1}$ ) entraînait une diminution de la biomasse correspondant à l'accumulation du glycérol. Cette évolution se faisait en parallèle avec l'augmentation de la concentration en acétate et la chute de celle du butyrate.

### 2.2.2. En présence de co-substrat (glycéraldéhyde):

- Quelle que soit la concentration de glycéraldéhyde ajouté, aucune quantité résiduelle de ce composé n'est détectée dans le milieu de culture, ce qui prouve qu'il est réduit en glycérol par la 1,3-PPD déshydrogénase.
- L'utilisation du glycérol augmente progressivement avec l'ajout de glycéraldéhyde jusqu'à une valeur maximum obtenue pour 1,5 mM soit une amélioration de 55%. Dans ces conditions, la consommation de glycérol dépasse 98% de la teneur du glycérol introduit.
- L'augmentation de l'utilisation du glycérol dans ces conditions a pour conséquence directe un doublement de la biomasse et une augmentation des produits de biosynthèse, de l'ordre de 75% pour l'acétate et le 1,3-PPD et de seulement 18% pour le butyrate. En conséquence le rapport acétate/butyrate augmente de 50%.

**Tableau 2.** Influence de la concentration du glyceraldéhyde sur la croissance de *C. butyricum* DSM 5431 cultivé en continu à un taux de dilution de 0,30 h<sup>-1</sup>. La concentration du glycérol est de 108 mM

Conc. GLD. (mM)	Biomasse (g/l)	GLD résiduel (mM)	glycérol utilisé (mM)	Produits formés (mM)			recouvrement Y <sub>PPD</sub>	recouvrement carboné (%)	<u>acétate</u> butyrate
				acétate	butyrate	1,3 PPD			
0	0,30	0	68,4 (5,7)	23,3 (2,4)	3,8 (0,4)	37,5 (3,8)	0,55	100	6,13
0,5	0,32	0	69,3 (6,2)	23,8 (2,3)	3,8 (0,3)	37,8 (3,7)	0,55	99,8	6,26
1	0,48	0	80,1 (7,5)	30,8 (3,1)	3,6 (0,3)	45,1 (4,4)	0,56	103,7	8,55
<b>1,5</b>	<b>0,64</b>	0	<b>106,3 (9,4)</b>	<b>40,8 (4,1)</b>	<b>4,5 (0,5)</b>	<b>65,7 (6,6)</b>	<b>0,62</b>	<b>108,6</b>	<b>9,06</b>
2	0,62	0	95,4 (8,4)	36,6 (3,7)	4,1 (0,4)	59,1 (6,1)	0,62	108,9	8,90

GLD = glyceraldéhyde

Y<sub>PPD</sub> = mole de 1,3-PPD produit / mole de glycérol utilisé

1,3-PPD = 1,3-propanediol

Les valeurs entre parenthèse sont des moyennes (± S.D.) de quatre expériences différentes

- A partir de 2 mM on n'observe plus d'augmentation de la biomasse, ni d'utilisation du glycérol et de biosynthèse des produits par ajout de glycéraldéhyde.
- L'ajout de glycéraldéhyde n'entraîne pas une modification significative de la répartition des flux carbonés selon les deux voies puisque le rendement en 1,3-propanediol n'augmente que de 13% et que le rapport acétate/butyrate ne s'inverse pas.

### *2.2.3. Comparaison des deux co-substrats*

Ces résultats obtenus en utilisant le glycéraldéhyde comme co-substrat ont été comparés avec ceux obtenus dans les mêmes conditions en présence de propionaldéhyde (Abbad-Andaloussi et coll., 1996c). Quelle que soit la nature du co-substrat ajouté on observe les mêmes évolutions mais pas pour les mêmes concentrations:

- Les **figures 1A** et **1B** montrent que l'ajout de l'un ou de l'autre co-substrat favorise la consommation du glycérol et la formation de la biomasse permettant d'obtenir des valeurs maximales à des concentrations de 0,32 mM pour le propionaldéhyde et 1,5 mM pour le glycéraldéhyde. Dans les deux cas, au delà de chaque maximum, il y a une légère diminution des deux paramètres. La **figure 1C** montre une diminution régulière de la vitesse spécifique d'utilisation du glycérol ( $q_{\text{glycérol}}$ ) en présence de glycéraldéhyde. Par contre il y a une augmentation transitoire puis une diminution à partir de 0.32 mM de propionaldéhyde ajouté.
- La **figure 2A** indique que les concentrations d'acétate produit dans les deux cas sont comparables et suivent l'évolution de la biomasse. Par contre la bactérie produit plus de butyrate par ajout de propionaldéhyde que de glycéraldéhyde (**figure 2B**) ce qui favorise le rapport acétate/butyrate en présence de glycéraldéhyde par rapport au propionaldéhyde (**figure 2C**).
- Quel que soit l'acide formé, les **figures 3A**, **3B** et **3C** montrent la même évolution de la vitesse spécifique correspondante en fonction du co-substrat ajouté selon que du glycéraldéhyde ou du propionaldéhyde est ajouté en parallèle avec l'utilisation du glycérol.

Figure 1 : Influence de l'ajout d'un cosubstrat sur la biomasse et l'utilisation du glycérol

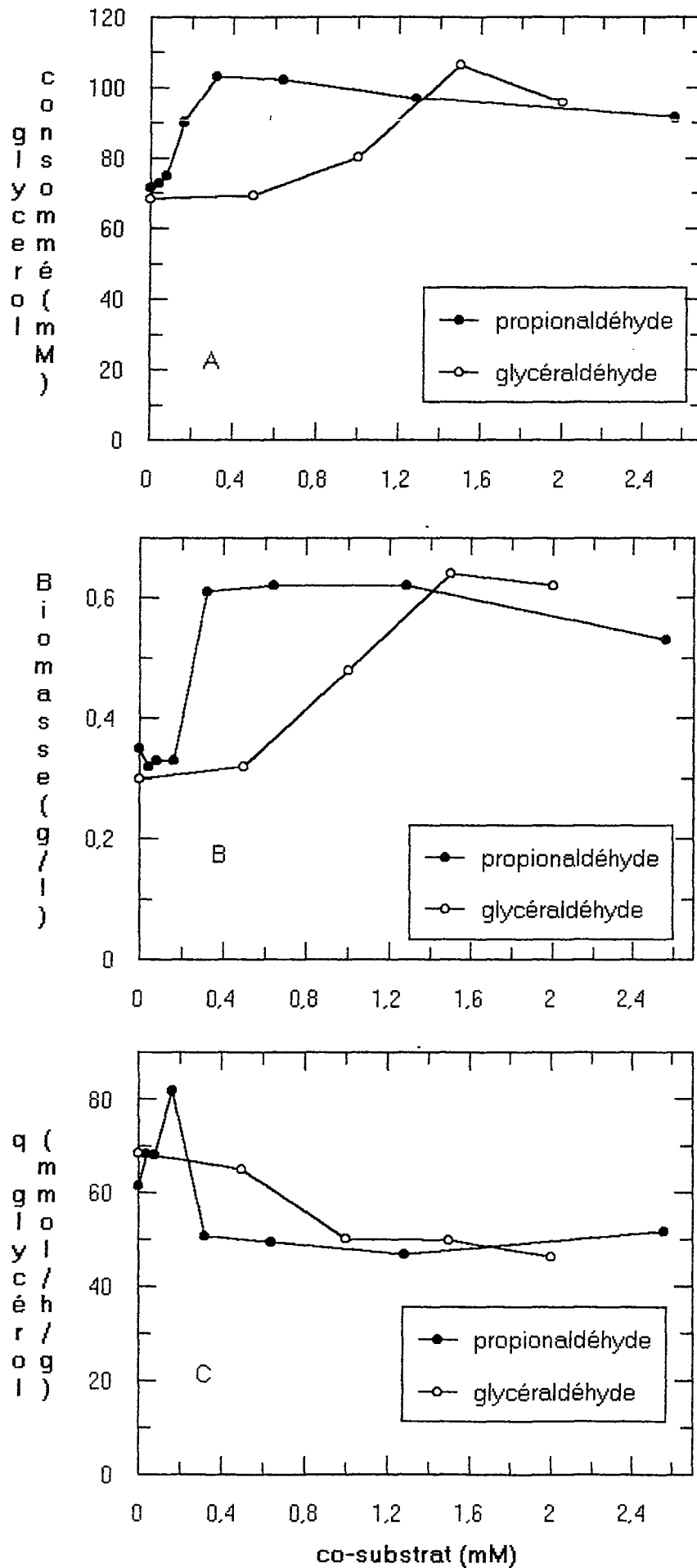
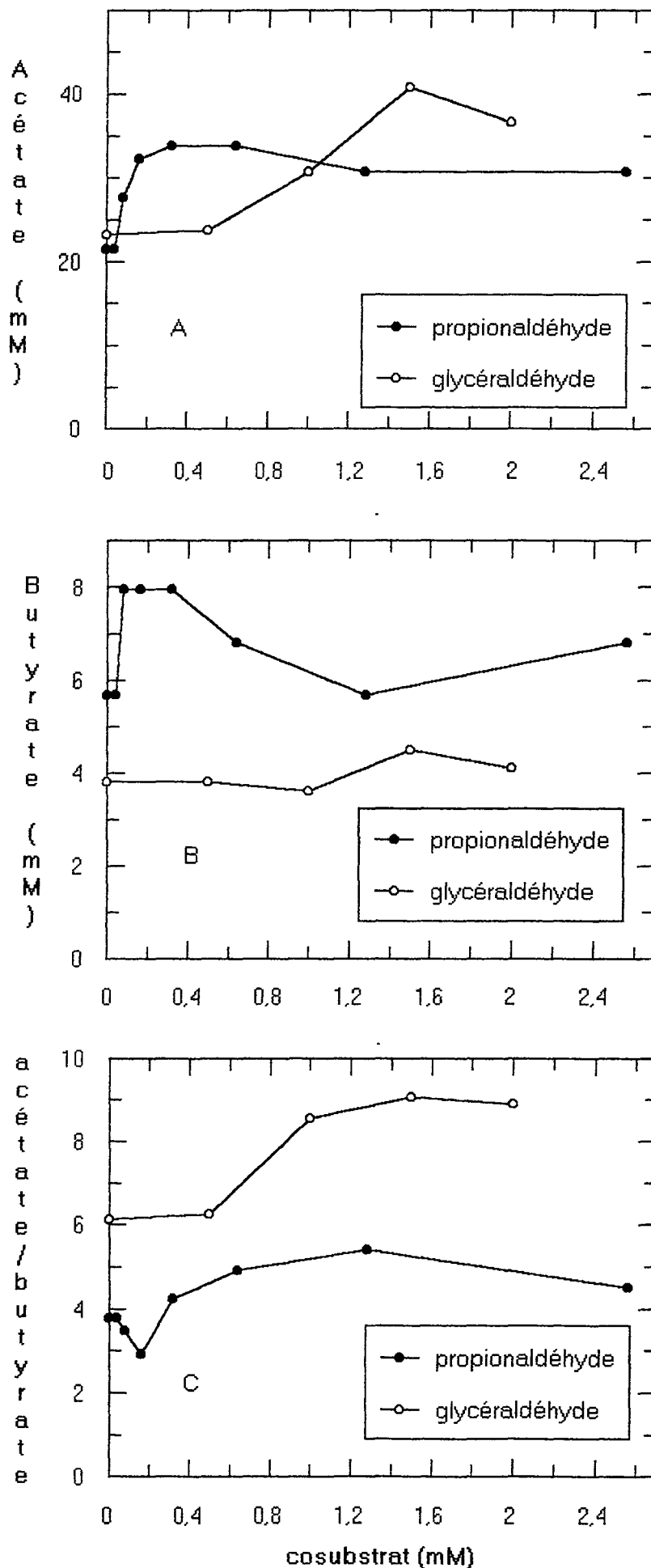
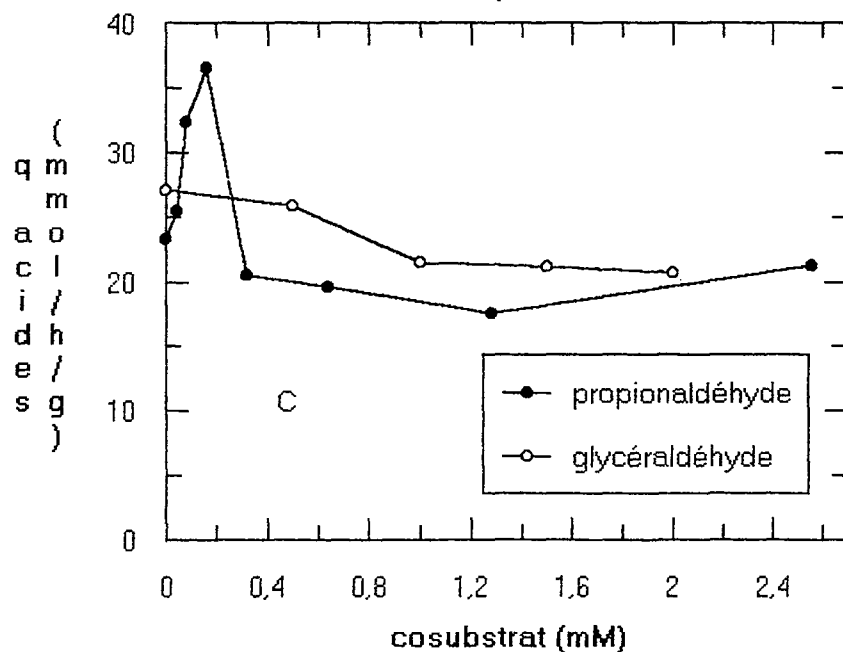
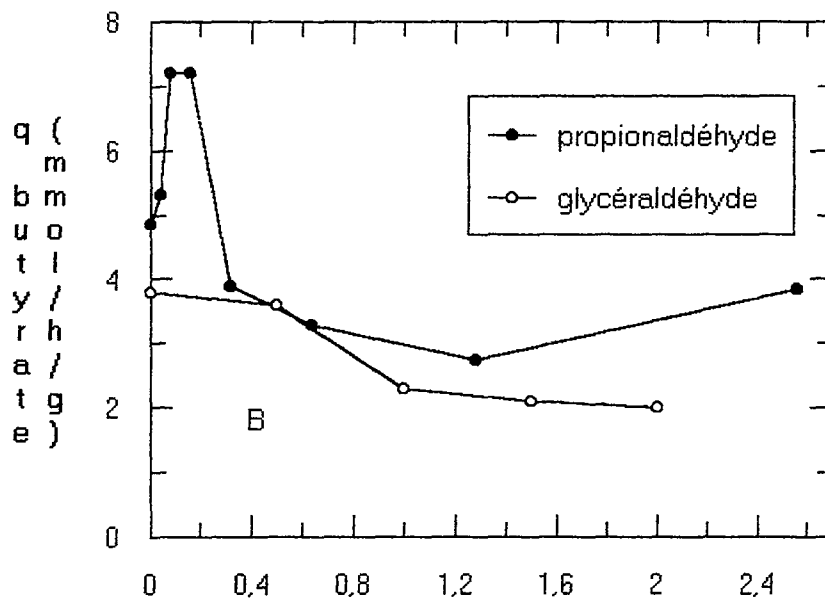
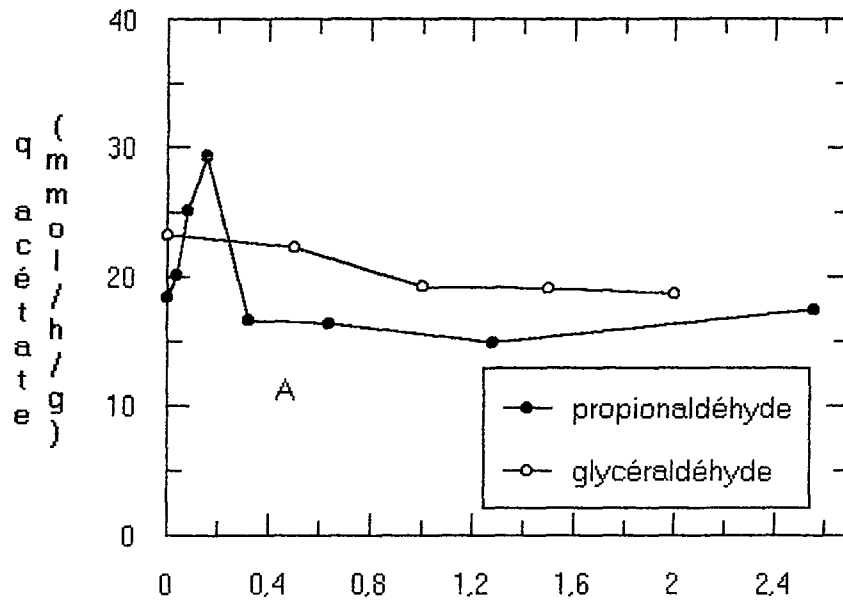


Figure 2 : Influence de l'ajout d'un cosubstrat sur l'acétate et le butyrate



**Figure 3 : Influence de l'ajout d'un cosubstrat sur les vitesses spécifiques de production des acides**





- La **figure 4B** indique que le rendement en 1,3-PPD est plus élevé en ajoutant du glycéraldéhyde ce qui est dû au fait qu'il y a plus de 1,3-PPD formé dans ce cas (**figure 4A**) et moins de butyrate (**figure 2B**). La **figure 4C** confirme que la vitesse spécifique de formation du 1,3-PPD est plus élevée en ajoutant du glycéraldéhyde que du propionaldéhyde.

En conclusion, l'utilisation de tels co-substrats a permis de montrer que l'activité 1,3-PPD déshydrogénase n'est pas limitante puisqu'il n'y a pas d'aldéhyde résiduel dans les deux cas et que c'est bien la glycérol déshydratase qui limite la production du 1,3-PPD. La croissance de *C. butyricum* DSM 5431 est meilleure sur glycérol plus co-substrats que sur glycérol seul. Les valeurs maximales sont observées pour une concentration de glycéraldéhyde de 1,5 mM et de 0,32 à 0,64 mM pour le propionaldéhyde. Au delà de ces concentrations il y a une diminution des paramètres fermentaires.

Les deux co-substrats ont le même effet sur la croissance de *C. butyricum*. En présence de propionaldéhyde, la meilleure stimulation est obtenue pour des concentrations plus faibles, dans ce cas l'effet est rapide mais transitoire. En présence de glycéraldéhyde, l'effet est plus long et régulier, avec une meilleure stimulation pour des concentrations plus élevées.

### **2.3. Influence de la vitesse spécifique d'utilisation du glycérol sur le taux intracellulaire des nucléotides chez *C. butyricum* DSM 5431 cultivé en continu**

Il a été montré précédemment que la variation du taux de dilution influence la consommation du glycérol (Abbad-Andaloussi et coll., 1996b). Nous avons recherché le même effet en réalisant des expériences à un taux de dilution donné faisant varier soit la concentration initiale de glycérol soit la concentration de glycéraldéhyde ajouté. L'ensemble de ces variations doit modifier la vitesse spécifique d'utilisation du glycérol ( $q$  glycérol) et en conséquence modifier également le taux intracellulaire des nucléotides chez cette souche. Pour vérifier cette hypothèse nous avons établi grâce à un logiciel d'exploitation des données une relation linéaire entre le glycérol et chacun de ces paramètres. Le **tableau 3** montre qu'une bonne corrélation entre chaque paramètre et le  $q$  glycérol peut être établie ce qui valide l'étude de la variation des taux des nucléotides en fonction de  $q$  glycérol selon chacun de ces 3 paramètres : taux de dilution, concentration de glycérol, ajout de glycéraldéhyde.

Figure 4 : Influence de l'ajout d'un cosubstrat sur le 1,3-PPD.

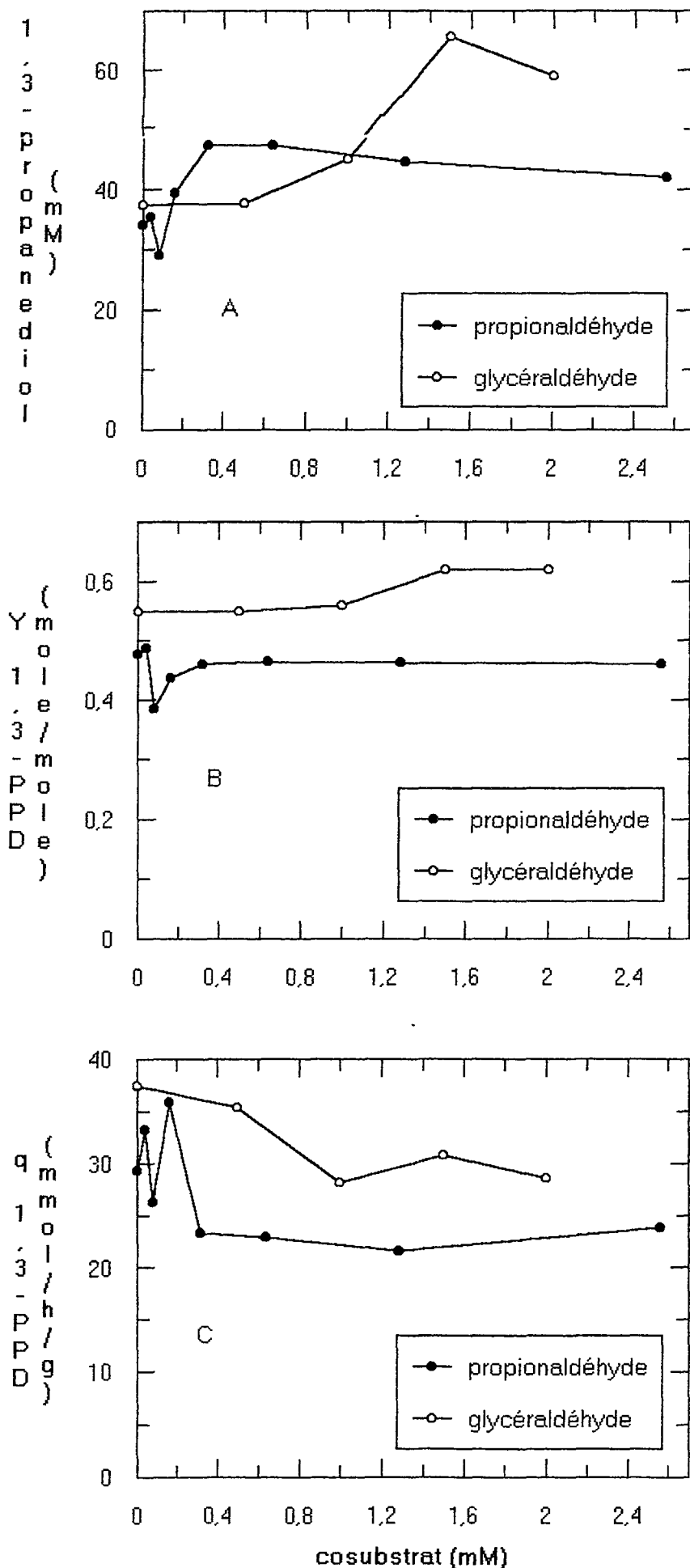


Tableau 3 : Relation entre le q glycérol et différents facteurs.  
Regression linéaire

A) Augmentation du taux de dilution (D).

Correlation Coefficient (r) = 0,9986

Variable	Valeur	Std. Err.
Intersection axe des Y	0,004	0,005
Pente	0,005	0,000
..		
q glycérol mmol/h/g	D (h-1)	Calculées
1	6,750	0,040
2	13,500	0,080
3	28,420	0,150
4	46,540	0,260
5	57,360	0,300
6	0,000	0,000

B) Augmentation de la concentration de glycérol.

Correlation Coefficient (r) = 0,9903

Intersection axe des Y -18,374 21,433  
Pente 9,975 0,701

	q glycérol mmol/h/g	glycérol mM	Calculées
1	12,500	108,000	106,317
2	17,500	151,200	156,194
3	27,500	237,600	255,947
4	41,000	354,240	390,614
5	52,000	540,000	500,342
6	0,000	0,000	-18,374

C) Ajout de glycéraldéhyde.

Correlation Coefficient (r) = -0,9382

Intersection axe des Y 5,133 0,891  
Pente -0,074 0,016.

..	q glycérol mmol/h/g	glycéraldéhyde mM	Calculées
1	68,400	0,000	0,074
2	64,900	0,500	0,333
3	50,100	1,000	1,428
4	49,800	1,500	1,450
5	46,200	2,000	1,716

### *2.3.1. Variation du q glycérol suivant le taux de dilution*

La **figure 5A** présente l'évolution du pool intracellulaire de  $\text{NAD}^+$ + $\text{NADH}$  et de la concentration en acétyl-CoA en fonction de la vitesse spécifique d'utilisation du glycérol. Dans ce cas, la variation du flux carboné est obtenue en faisant varier le taux de dilution de 0,04 à 0,30  $\text{h}^{-1}$  pour une concentration en glycérol fixe de 108 mM. Cette figure montre une linéarité entre la vitesse spécifique d'utilisation du glycérol et le pool intracellulaire des nucléotides. On constate qu'en augmentant le flux carboné il y a une augmentation du pool intracellulaire  $\text{NAD}^+$ + $\text{NADH}$  et aussi une augmentation de la concentration de l'acétyl-CoA.

Les **tableaux 4A** et **5A** montrent que lorsque le flux carboné illustré par le q glycérol augmente de 8 fois, la concentration du pool  $\text{NAD}^+$ + $\text{NADH}$  est multipliée par 4 (**tableau 4A**) et celle de l'acétyl-CoA est multipliée par 2 (**tableau 5A**).

### *2.3.2. Variation du q glycérol suivant la concentration de glycérol*

La **figure 5B** représente l'évolution du pool intracellulaire de  $\text{NAD}^+$  +  $\text{NADH}$  et des concentrations en acétyl-CoA en fonction de la vitesse spécifique d'utilisation du glycérol. Dans ce cas, la variation du flux carboné est obtenue en faisant varier les concentrations en glycérol de 108 à 540 mM pour un taux de dilution fixe de 0,08 $\text{h}^{-1}$ , taux pour lequel il n'y a pas de glycérol résiduel détecté quelle que soit sa concentration initiale.

On constate qu'il existe une relation linéaire entre la vitesse spécifique d'utilisation du glycérol et le taux intracellulaire des nucléotides puisque en augmentant la vitesse spécifique d'utilisation du glycérol, il y a une augmentation du pool  $\text{NAD}^+$ + $\text{NADH}$  et de la concentration en acétyl-CoA.

Les **tableaux 4B** et **5B** montrent que lorsque le flux carboné augmente de 4 fois, la concentration du pool  $\text{NAD}^+$  +  $\text{NADH}$  augmente de 70% (**tableau 4B**) et celle de l'acétyl-CoA est multipliée par 2 (**tableau 5B**).

En conclusion, le pool  $\text{NAD}^+$ + $\text{NADH}$ , et la concentration d'acétyl-CoA augmentent avec l'augmentation du flux carboné que ce flux soit obtenu à concentration de glycérol constante et taux de dilution croissant ou à taux de dilution constant et concentration de glycérol croissante. L'augmentation d'acétyl-CoA indique que son utilisation via l'acétate ou le butyrate devient limitée.

Figure 5 : Influence de la vitesse spécifique d'utilisation du glycérol sur le taux intracellulaire des nucléotides

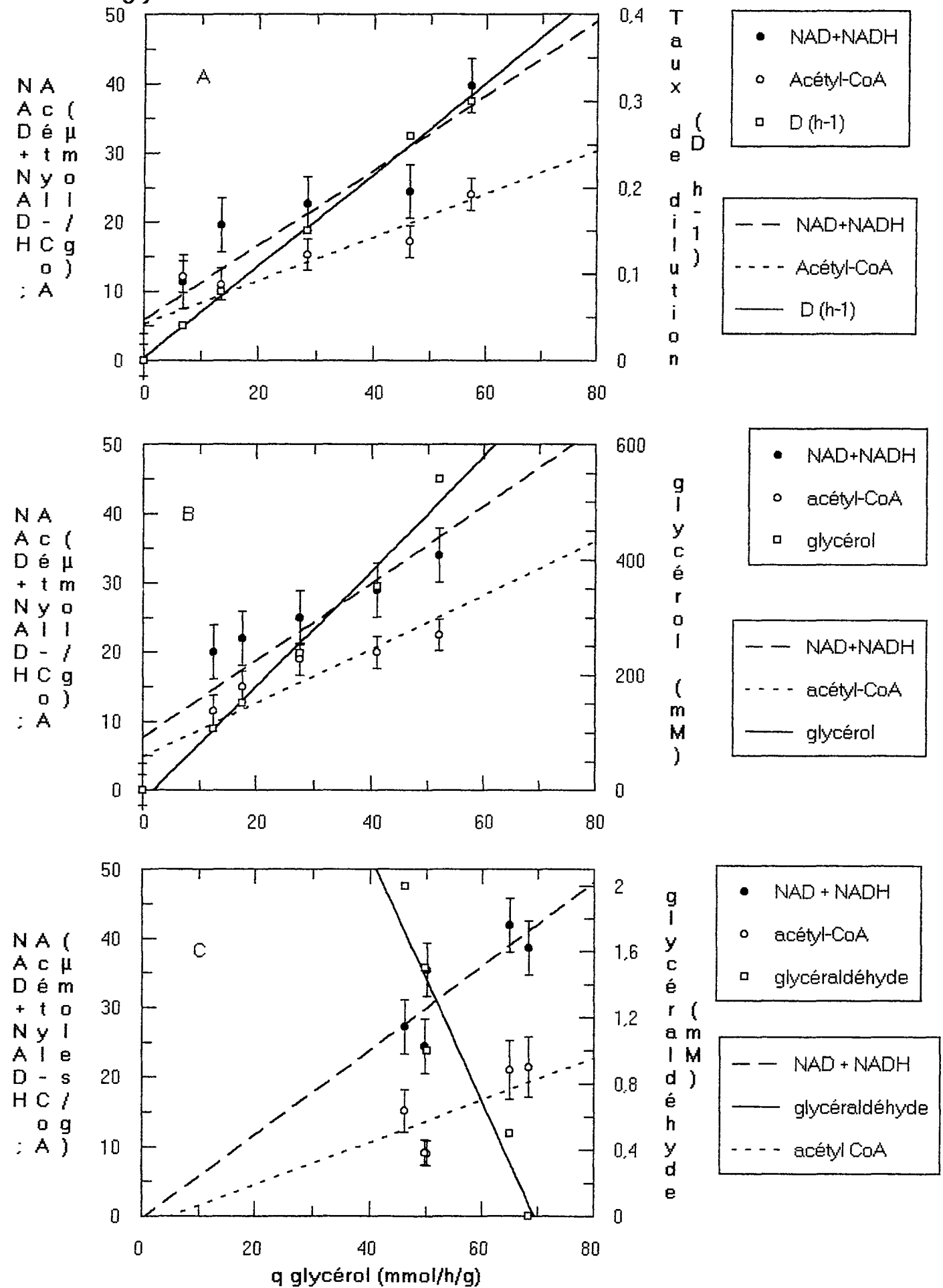


Tableau 4 : Influence du q glycérol sur le pool NAD+NADH  
Régression linéaire

A) Augmentation du taux de dilution (D).

Correlation Coefficient (r) = 0,9227

Variable	Valeur	Std. Err.
Intersection axe des Y	5,947	3,706
Pente	0,540	0,113

	q glycérol mmol/h/g	NAD+NADH μmol/g	Calculées
1	6,750	11,400	9,589
2	13,500	19,600	13,231
3	28,420	22,700	21,281
4	46,540	24,500	31,057
5	57,360	39,800	36,895
6	0,000	0,000	5,947

B) Augmentation de la concentration de glycérol.

Correlation Coefficient (r) = 0,9073

Intersection axe des Y	7,694	3,945
Pente	0,557.	0,129

	q glycérol mmol/h/g	NAD+NADH μmol/g	Calculées
1	12,500	20,000	14,657
2	17,500	22,000	17,442
3	27,500	25,000	23,013
4	41,000	29,000	30,533
5	52,000	34,000	36,660
6	0,000	0,000	7,694

C) Ajout de glycéraldéhyde.

Correlation Coefficient (r) = 0,9678

Intersection axe des Y	-0,037	4,041
Pente	0,601	0,078

	q glycérol mmol/h/g	NAD+NADH μmol/g	Calculées
1	68,400	38,600	41,072
2	64,900	41,900	38,968
3	50,100	35,500	30,074
4	49,800	24,500	29,893
5	46,200	27,200	27,730
6	0,000	0,000	-0,037

Tableau 5 : Influence du q glycérol sur le taux d'acétyl-CoA.  
Regression linéaire

A) Augmentation du taux de dilution (D).

Correlation Coefficient (r) = 0,899

Variable	Valeur		Std. Err.
Intersection axe des Y	5,289		2,519
Pente	0,314		0,077
	q glycérol mmol/h/g	acétyl-CoA μmol/g	Calculées
1	6,750	12,100	7,411
2	13,500	11,000	9,533
3	28,420	15,300	14,224
4	46,540	17,200	19,921
5	57,360	24,100	23,323
6	0,000	0,000	5,289

B) Augmentation de la concentration de glycérol.

Correlation Coefficient (r) = 0,9105

Intersection axe des Y 4,909 2,699  
Pente 0,389 0,088

	q glycérol mmol/h/g	acétyl-CoA μmol/g	Calculées
1	12,500	11,500	9,771
2	17,500	15,000	11,717
3	27,500	19,000	15,607
4	41,000	20,000	20,859
5	52,000	22,500	25,138
6	0,000	0,000	4,909

C) Ajout de glycéraldéhyde.

Correlation Coefficient (r) = 0,9019

Intersection axe des Y -1,461 3,757  
Pente 0,304 0,073

	q glycérol mmol/h/g	acetyl-CoA μmol/g	Calculées
1	68,400	21,500	19,315
2	64,900	21,100	18,252
3	50,100	9,100	13,757
4	49,800	9,200	13,665
5	46,200	15,200	12,572
6	0,000	0,000	-1,461

### 2.3.3. Variation du $q$ glycérol suivant l'ajout de glycéraldéhyde

L'augmentation de la vitesse spécifique du catabolisme du glycérol conduit à l'augmentation du rapport  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  ainsi que du pool intracellulaire  $\text{NAD}^++\text{NADH}$ . L'accumulation du NADH prouve que sa réoxydation par la 1,3-PPD déshydrogénase est limitée par la production de 3-HPA.

Il existe une relation linéaire entre la vitesse spécifique d'utilisation du glycérol et le taux intracellulaire des nucléotides et d'acétyl-CoA chez *C. butyricum* DSM 5431 (**figures 5A et 5B**). La **figure 5C** et les **tableaux 4C et 5C** montrent que l'ajout de glycéraldéhyde fait chuter la vitesse spécifique d'utilisation de glycérol et donc le taux intracellulaire des nucléotides de façon linéaire.

Le **tableau 6** présente le taux des nucléotides obtenus en phase stationnaire lors de la culture en continu de *C. butyricum* DSM 5431 à  $D=0,30 \text{ h}^{-1}$ . On constate que la baisse du flux carboné en présence de concentration de glycéraldéhyde égale à 1,5 mM a entraîné une chute des taux intracellulaires des nucléotides et plus précisément:

- une diminution de la concentration de NADH de l'ordre de 44%;
- une diminution du pool  $\text{NAD}^+ + \text{NADH}$  de l'ordre de 37%;
- une diminution du rapport  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  d'un facteur 2;
- une diminution de la concentration d'acétyl-CoA de l'ordre de 57%.

Cependant, les valeurs du pool  $\text{NAD}^+ + \text{NADH}$  obtenues dans les deux cas (avec ou sans glycéraldéhyde) sont plus importantes que celles décrites habituellement chez les autres bactéries. En effet, la concentration habituelle chez les Clostridia est comprise entre 7 et 14  $\mu\text{moles}$  de  $\text{NAD}^++\text{NADH}$  par gramme de cellules (Meyer et Papoutsakis, 1989).

En conclusion, l'ajout de glycéraldéhyde permet une meilleure utilisation du NADH accumulé puisque sa concentration diminue. En plus, quelle que soit l'origine de la variation de la vitesse spécifique d'utilisation du glycérol soit par augmentation du taux de dilution, soit par augmentation de la concentration de glycérol, soit par ajout de glycéraldéhyde dans le milieu de culture, on obtient dans les 3 cas une relation linéaire identique entre la vitesse spécifique d'utilisation du glycérol et le taux intracellulaire de  $\text{NAD}^++\text{NADH}$  et d'acétyl-CoA (**tableaux 4 et 5**).



**Tableau 6 .** Taux de nucléotides obtenues en état stationnaire lors de la culture en continu de *C. butyricum* DSM 5431 à un taux de dilution de 0,30 h<sup>-1</sup> avec 108 mM de glycérol

Conc GLD (mM)	Concentration des nucléotides (μmol/g de cellules sèches)				
	NAD <sup>+</sup>	NADH	NADH/NAD <sup>+</sup>	NAD + NADH	Acetyl-CoA
0	7,1 (0,6)	31,5 (2,8)	4,4	38,6	21,5 (2,3)
0,5	7,9 (0,8)	34,0 (3,1)	4,3	41,9	21,1 (2,2)
1	10,3 (0,9)	25,2 (2,6)	2,4	35,5	9,1 (1,0)
1,5	6,7 (0,5)	17,8 (1,8)	2,6	24,5	9,2 (1,1)
2	8,3 (0,7)	18,9 (2,0)	2,3	27,2	15,2 (1,7)

GLD = glycéraldéhyde

Les valeurs entre parenthèse sont des moyennes (± S.D.) de quatre expériences différentes

En faisant la moyenne des 3 valeurs obtenues on obtient les pentes respectives suivantes:

- pool NAD<sup>+</sup>+NADH : 0,566 +/- 0,018
- acétyl CoA : 0,366 +/- 0,031

#### **2.4. Effet du glycéraldéhyde sur les activités enzymatiques de *C. butyricum* DSM 5431 cultivé sur glycérol à un fort taux de dilution (0,30 h<sup>-1</sup>)**

On a montré que le taux intracellulaire des nucléotides diminue en présence de co-substrat, le glycéraldéhyde. Cette variation pourrait avoir une repercussion sur les activités des enzymes liées à l'utilisation du glycérol et la formation des produits :

- ◆ la glycérol déshydrogénase (EC 1.1.1.6),
- ◆ la glycérol déshydratase (EC 4.2.1.30),
- ◆ la 1,3-propanediol déshydrogénase (EC 1.1.1.202),
- ◆ l'acétate kinase (EC 2.7.2.1),
- ◆ la butyrate kinase (EC 2.7.2.7).

Le **tableau 7** présente les activités spécifiques de ces enzymes de *C. butyricum* DSM 5431 à D= 0,30 h<sup>-1</sup> sur glycérol 108 mM en présence de concentrations en glycéraldéhyde comprises entre 0,5 et 2 mM. Même si le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> et le flux carboné diminuent en présence de glycéraldéhyde celui-ci n'a aucun effet sur les activités enzymatiques testées. L'activité acétate kinase reste supérieure à l'activité butyrate kinase (5 à 7 fois) ce qui confirme que l'acétate reste favorisé par rapport au butyrate en présence de glycéraldéhyde. Ce résultat explique en partie la déviation du flux carboné du butyrate à l'acétate et l'augmentation du rapport acétate/butyrate. En conclusion, l'action du glycéraldéhyde ne se situe pas au niveau de ces activités enzymatiques.

**Tableau 7.** Effet de la concentration en glycéraldéhyde sur les activités enzymatiques des extraits acellulaires obtenus en état stationnaire lors de la culture en continu de *C. butyricum* DSM 5431 à un taux de dilution de 0,30 h<sup>-1</sup>.

Conc. GLD. (mM)	Activités spécifiques( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )					
	Glycérol Déshydrogénase	Glycérol Déshydratase	1,3-PPD Déshydrogénase	Acétate kinase	Butyrate kinase	
0	2,36 (0,31)	0,35 (0,07)	1,31 (0,14)	8,63 (0,82)	1,21 (0,13)	
0,5	2,28 (0,25)	0,36 (0,06)	1,52 (0,16)	8,81 (0,91)	1,34 (0,14)	
1	2,23 (0,28)	0,39 (0,08)	1,43 (0,15)	7,90 (0,81)	1,52 (0,15)	
1,5	2,16 (0,23)	0,37 (0,07)	1,47 (0,14)	7,61 (0,78)	1,40 (0,15)	
2	2,14 (0,22)	0,36 (0,06)	1,43 (0,13)	7,12 (0,73)	1,26 (0,13)	

GLD = glycéraldéhyde

Les valeurs entre parenthèse sont des moyennes ( $\pm$  S.D.) de quatre expériences différentes

1,3-PPD = 1,3-propanediol

## 2.5. Effet du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> sur l'activité enzymatique de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de *C. butyricum* DSM 5431

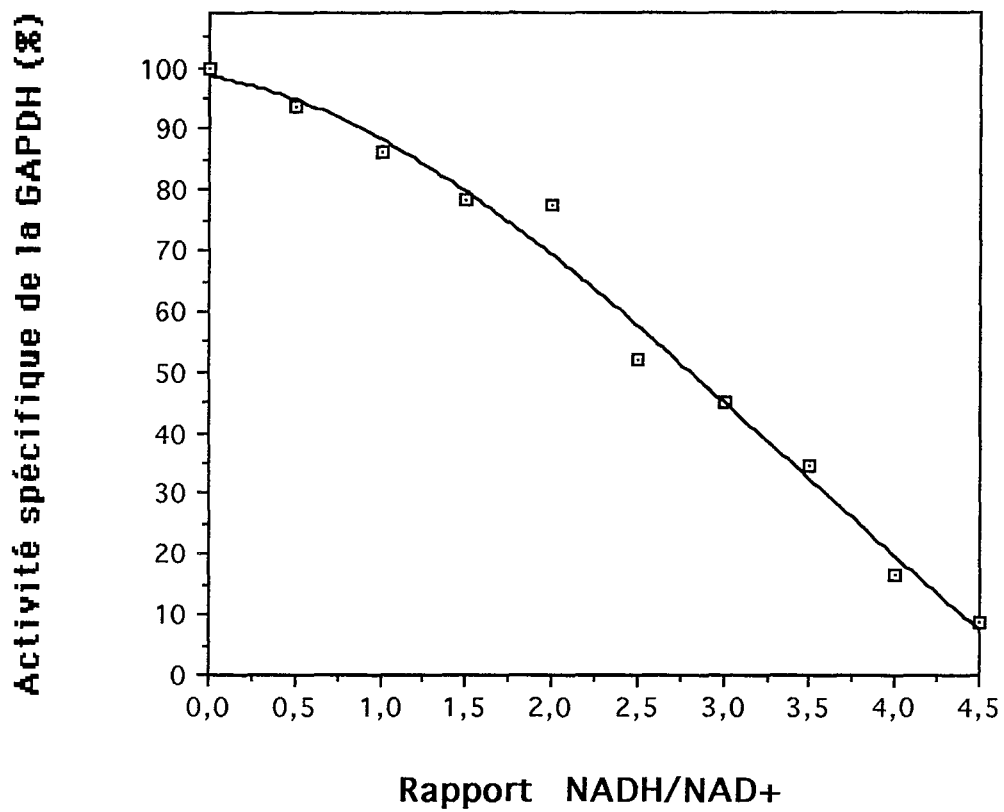
Le taux élevé du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> reporté durant la fermentation du glycérol par *C. butyricum* à un taux de dilution élevé et en absence de co-substrat peut inhiber quelques enzymes clés conduisant au pyruvate telle que la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH (EC 1.2.1.12)) et ainsi limiter la capacité du micro-organisme de consommer le glycérol.

Il a été montré précédemment que l'ajout de glycéraldéhyde dans le milieu de culture de *C. butyricum* DSM 5431 cultivée sur glycérol à un fort taux de dilution a pour effet la diminution d'un facteur 2 de la concentration de NADH et aussi du rapport NADH/NAD<sup>+</sup>. On peut faire l'hypothèse que cet effet peut lever l'inhibition d'enzymes clé conduisant au pyruvate et ainsi favoriser l'utilisation du glycérol. Pour confirmer cette hypothèse, l'effet du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> sur la GAPDH a été étudié in vitro sur un extrait de cette bactérie.

La **figure 6** montre que l'activité de la GAPDH est influencée par le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> chez *C. butyricum* DSM 5431. On note une inhibition significative de la GAPDH par le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> puisque l'activité de la GAPDH diminue avec l'augmentation du rapport NADH/NAD<sup>+</sup>. Quand *C. butyricum* est cultivé sur glycérol en absence de glycéraldéhyde, le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> est égale à 4,4, taux pour lequel l'inhibition de la GAPDH est de 90%. L'activité de la GAPDH est alors trop faible pour permettre une bonne croissance bactérienne. Par contre quand la concentration du glycéraldéhyde augmente dans le milieu de culture, la conversion du glycéraldéhyde en glycérol conduit à la diminution du flux carboné et du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> jusqu'à 2,3-2,6, ce qui entraîne une régénération de l'activité GAPDH de l'ordre de 50%. Ainsi, l'augmentation de l'activité GAPDH conduit à l'augmentation de l'utilisation du glycérol, de la production de biomasse, de la formation de 1,3-PPD et des acides.

Ce résultat confirme le résultat obtenu chez *C. acetobutylicum* (Girbal et Soucaille, 1994) et *E. agglomerans* (Barbirato et coll., 1997b) où il a été montré à chaque fois que l'activité de la GAPDH est aussi influencée par le rapport NADH/NAD<sup>+</sup>.

En conclusion, cette étude a également permis de montrer que le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> intervient sur l'activité de la GAPDH ce qui permet à la bactérie de contrôler le flux carboné vers la production des acides acétique et butyrique.



**Figure 6 :** Effet du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> sur l'activité de la GAPDH de *C. butyricum* DSM 5431

### 3. CONCLUSION

La **figure 7** montre que chez *C. butyricum* le flux carboné se répartit au niveau de deux branchements métaboliques (B1 et B2):

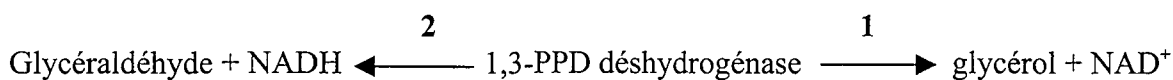
- Le premier branchement (B1) permet à la bactérie de répartir le glycérol entre la production de 1,3-propanediol et celle de pyruvate.
- Le deuxième branchement (B2) permet à la bactérie de produire à partir d'acétyl-CoA de l'acétate et du butyrate.

Les travaux précédents ont permis d'envisager deux niveaux de régulation impliqués dans le premier branchement du métabolisme du glycérol chez *C. butyricum* DSM 5431:

- ✓ le premier niveau correspond à la limitation de la voie de production du 1,3-propanediol par l'activité de la glycérol déshydratase, ce qui permet à la bactérie d'éviter toute accumulation du 3-HPA (étape limitante 1).

La confirmation de l'influence du 3-HPA et de l'importance des concentrations intracellulaires des nucléotides a été réalisée en étudiant l'effet de l'apport du glycéraldéhyde à la souche bactérienne. En effet lorsque *C. butyricum* DSM 5431 est cultivé en continu à un taux de dilution égale à  $0,30 \text{ h}^{-1}$ , le glycérol s'accumule puisque seulement 6 g du substrat est utilisé alors que 10 g sont présents dans l'alimentation. L'apport de glycéraldéhyde au milieu de culture à des concentrations de l'ordre de 1 à 2 mM n'est pas toxique et permet alors à la cellule d'utiliser la totalité du glycérol.

La présence de fortes concentrations intracellulaires en NADH nous indique que ce nucléotide pourrait être l'élément clé responsable de la régulation des oxydo-réductases chez la bactérie. En effet il a été montré qu'un taux de dilution élevé provoquait l'augmentation du flux carboné et conduisait au blocage de la voie métabolisant le glycérol empêchant ainsi la bactérie de réoxyder les éléments réduits synthétisés. Dans ces conditions, l'addition de propionaldéhyde ou de glycéraldéhyde a permis de montrer que ces co-substrats peuvent être réduits par la 1,3-propanediol déshydrogénase et ainsi diminuer la concentration intracellulaire de NADH selon les réactions suivantes:



Cette diminution se produit lorsque la réaction ci dessus évolue dans le sens 1 et entraîne de fait le déblocage du flux carboné.

Le fait que *C. butyricum* DSM 5431 utilise in vivo la totalité du glycéraldéhyde ajouté au milieu de culture prouve que la 1,3-propanediol déshydrogénase n'est pas une étape limitante dans la cellule. Cette conclusion est renforcée si l'on prend en considération la valeur élevée du  $K_m$  apparent de l'enzyme pour le glycéraldéhyde par rapport à celle pour le 3-HPA. L'enzyme 1,3-propanediol déshydrogénase a deux substrats: le NADH et le 3-HPA et contrairement à ce qui était envisageable en premier, ce n'est pas le NADH qui est l'élément limitant dans la production du 1,3-propanediol mais le 3-HPA. Dans ce cas, des deux enzymes qui conduisent du glycérol au 1,3-propanediol c'est la glycérol déshydratase qui est présente en quantité limitante. Ce mode de régulation a été sélectionné par *C. butyricum* lors d'une croissance sur glycérol car il évite l'accumulation de 3-HPA qui serait létale pour la cellule puisque le 3-HPA est un composé hautement toxique.

L'augmentation de la concentration du glycéraldéhyde dans le milieu de culture a pour conséquence une augmentation de la biomasse, une augmentation de l'utilisation du glycérol et une augmentation de la production non seulement du 1,3-propanediol mais aussi des acides: acétate et butyrate.

De ce fait l'ajout de glycéraldéhyde influence le deuxième niveau de régulation:

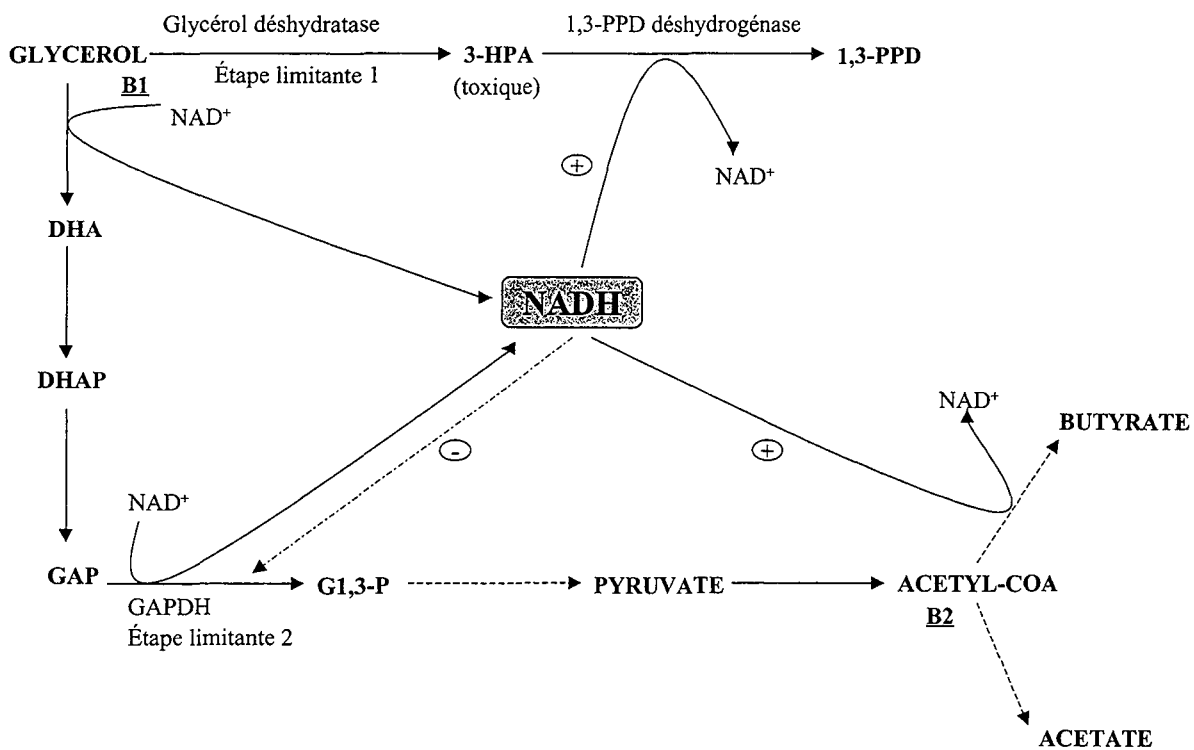
- ✓ le second niveau correspond à la limitation de la voie de production des acides par l'activité GAPDH ( étape limitante 2) afin d'éviter l'accumulation de très fortes concentrations de NADH intracellulaire responsable de la limitation de l'utilisation du glycérol.

En effet, nous avons démontré in vitro qu'un rapport NADH/NAD<sup>+</sup> élevé a un effet inhibiteur sur l'activité GAPDH démontrant ainsi son rôle important dans le métabolisme du glycérol chez *C. butyricum* par le contrôle du flux carboné à travers les cellules. L'ajout de 1,5 mM de glycéraldéhyde dans le milieu de culture avec un fort taux de dilution permet de diminuer de moitié ce rapport entraînant ainsi une moindre inhibition de l'activité GAPDH puisque le taux d'inhibition de cette dernière n'est plus que de 50%. Le déblocage de cette activité permet à la bactérie d'utiliser le glycérol résiduel et de produire un complément d'énergie qui permet l'augmentation de la biomasse.

Les deux branchements du métabolisme du glycérol ne sont pas soumis au même type de régulation. En effet, le deuxième branchement présente une grande flexibilité métabolique puisque la bactérie peut produire selon les conditions de culture, soit plus, soit moins d'acide acétique que d'acide butyrique. A l'inverse, le premier branchement est soumis, quelque soit

le niveau de régulation à un contrôle très strict puisque la valeur de conversion du glycérol en 1,3-propanediol a toujours une valeur voisine de 0,58 quel que soit le paramètre que l'on fait varier.

Ces résultats s'expliquent par le fait que, alors que les activités spécifiques des acétate et butyrate kinases appartenant au deuxième branchement peuvent varier dans un rapport aussi élevé que celui de 16/1 (Abbad-Andaloussi et coll., 1996b), celles de la glycérol déshydrogénase, de la glycérol déshydratase et de la 1,3-propanediol déshydrogénase appartenant au premier branchement évoluent en parallèle. Cette régulation très rigide exercée au niveau du premier branchement assure en toutes circonstances une concentration intracellulaire en NADH élevée qui module la consommation du glycérol.



**Figure 7:** Rôle central du NADH dans la régulation du flux carboné chez *C. butyricum*.

**B1:** premier branchement.

**B2:** deuxième branchement.



---

## Partie 2 : ETUDE DE L'EFFET DE COFERMENTATION GLUCOSE-GLYCEROL SUR LE FLUX CARBONE CHEZ *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* E5 ET E5 MD CULTIVES EN CHEMOSTAT

---

### 1. INTRODUCTION

Dans la première partie du travail nous avons utilisé une souche de collection *C. butyricum* DSM 5431. Nous avons montré que l'activité glycérol déshydratase est l'étape limitante de la production du 1,3-propanediol liée à l'utilisation du NADH. Cette limitation entraîne une régulation qui ne permet pas d'augmenter le rendement en 1,3-PPD. Pour améliorer ce rendement nous avons choisi une souche plus performante isolée dans notre laboratoire. Cette souche appelée E5 est capable de fermenter le glycérol commercial mais également le glycérol industriel issu de la transestérification d'huile de colza sans prétraitement préalable (Petitdemange et coll., 1995).

D'après les études précédentes il apparaît que le mode de fermentation et la nature de la souche influence les résultats de la fermentation, en particulier, l'utilisation du glycérol, la production en 1,3-PPD et le rendement en 1,3-PPD. Ainsi le **tableau 1** montre que quelle que soit la souche étudiée, le passage du mode batch au fed-batch améliore les quantités de glycérol utilisé et le 1,3-PPD produit sans modifier le rendement en 1,3-PPD ( $Y_{1,3-PPD}$ ).

**Tableau 1:** Evolution des paramètres fermentaires lors du passage batch au fed-batch chez 3 souches de *C. butyricum*.

Souche utilisée	Glycérol utilisé (%)	1,3-PPD produit (%)	$Y_{1,3-PPD}$ (X)
DSM 5431 WT	+ 41	+ 42,5	1
DSM 5431 mutant	+ 210	+ 218	1,04
E5 WT	+ 230	+ 225	0,98

WT: Wild-type.

Le **tableau 2** permet de constater que les quantités de glycérol utilisé et de 1,3-PPD produit sont améliorées en utilisant la souche E5 au lieu de la souche DSM 5431 en culture fed-batch.

**Tableau 2:** Comparaison des paramètres fermentaires d'une culture en fed-batch par substitution de la souche E5 WT à la souche DSM 5431 WT.

Mode de fermentation	Glycérol utilisé (%)	1,3-PPD produit (%)	$Y_{1,3-PPD}$ (X)
Fed-batch	+ 40	+ 47	1,06

NB: Les valeurs indiquées dans les tableaux ont été déduites à partir des données de la littérature citées dans la partie bibliographique de cette thèse.

Ces résultats montrent que la technique fed-batch est le meilleur mode de fermentation et que la souche E5 est plus performante que la souche DSM 5431. Cependant le mode fed-batch présente l'inconvénient de générer une inhibition par les produits de fermentation lorsqu'ils sont présents en excès dans le milieu de culture. En effet, il apparaît que la souche E5 est moins sensible au substrat et aux produits par rapport à la souche DSM 5431 puisqu' à des concentrations de 200 g/L de glycérol et 40 g/L de 1,3-PPD la souche E5 présente des pourcentages d'inhibitions de 66 et 36% respectivement alors que la souche DSM 5431 est totalement inhibée (Petitdemange et coll., 1995). Afin de limiter ces effets inhibiteurs et pour rendre la souche E5 moins sensible, le mode de fermentation en continu a été utilisé lors des études décrites ci-après.

*C. butyricum* est un micro-organisme capable de dégrader de nombreuses sources de carbone. Les produits de la fermentation du glucose par cette bactérie sont constitués d'acide acétique, d'acide butyrique, de CO<sub>2</sub> et d'hydrogène. Si le glycérol est présent dans le milieu de culture le produit majoritaire devient le 1,3-PPD. Nous envisageons d'améliorer le rendement en 1,3-PPD en ajoutant progressivement du glucose dans un milieu de culture contenant une concentration fixe de glycérol. La présence de glucose permettra alors de dévier le flux carboné vers la voie de production du 1,3-PPD. Il sera alors possible de déterminer, selon la souche étudiée, des seuils physiologiques permettant d'augmenter la teneur en 1,3-PPD dans le milieu de culture tout en conservant un taux de conversion du glycérol élevé. Ces différentes valeurs seront également comparées avec celles obtenues dans les mêmes conditions avec un mutant de la souche E5 sauvage, appelé E5-MD, particulièrement résistant à l'alcool allylique et de fait moins sensible à l'accumulation du 1,3-PPD.

## 2. RESULTATS

Les résultats des expériences de l'étude de l'effet de cofermentation glucose-glycérol sur le flux carboné chez *C. butyricum* E5 et E5 MD cultivés en chemostat sont présentés dans l'article intitulé: "Influence of glucose on glycerol metabolism by wild and mutant strains of *C. butyricum* E5 grown in chemostat culture".

**ERRATUM** : Dans la publication qui suit, le terme **glu** a été utilisé comme abréviation pour le glucose. En fait, le terme **glu** est l'abréviation utilisée pour la glutamine alors que celle pour le glucose est **glc**.

Hassiba Malaoui · Régis Marczak

## Influence of glucose on glycerol metabolism by wild-type and mutant strains of *Clostridium butyricum* E5 grown in chemostat culture

Received: 19 May 2000 / Received revision: 14 August 2000 / Accepted: 16 August 2000 / Published online: 7 December 2000  
© Springer-Verlag 2000

**Abstract** In order to improve the yield of 1,3-propanediol (1,3-PPD) in *Clostridium butyricum* E5, we carried out cofermentation experiments on glucose/glycerol mixtures in chemostat culture. The results showed the influence of the ratio of the two carbon substrates on the production of the required diol. The progressive increase of glucose in culture medium containing a given concentration of glycerol made it possible to highlight the deviation of carbon flow from the oxidative towards the reducing pathway, in order to maintain the oxidation/reduction balance in the cell. The conversion of glycerol into 1,3-PPD thus increased from 0.63 mol mol<sup>-1</sup>, without the addition of glucose, to a maximum of 0.89 mol mol<sup>-1</sup> for a molar glucose/glycerol ratio of 0.2 for the wild-type strain. The same experiments carried out with the mutant MD strain, which is resistant to allyl alcohol, led to similar results but with a maximum of 0.84 mol mol<sup>-1</sup> for a glucose/glycerol molar ratio of 0.1. Beyond a molar ratio of 0.2, the biosynthesis of enzymes for the glycerol metabolism was less subject to catabolic repression by glucose in the mutant MD strain than in the wild-type strain.

### Introduction

During the past several years, there has been an increase in research and development efforts involving clostridial fermentations, namely the branched fermentative pathways of butyric acid bacteria (Woods 1993). Among them, *Clostridium butyricum* is known as a classical acid producer and usually ferments glucose to butyrate, acetate, carbon dioxide and molecular hydrogen (Jungermann et al. 1973). Like *C. butyricum*, some clostridial species

can convert glycerol to 1,3-propanediol (Forsberg 1987; Heyndrickx et al. 1991).

In *C. butyricum*, growth on glycerol is preceded by the induction of four enzymes: glycerol dehydrogenase (GDH), dihydroxyacetone kinase, glycerol dehydratase and 1,3-PPD dehydrogenase, which constitute a branch point dividing the carbon flow toward 1,3-PPD and pyruvate biosynthesis (Biebl 1991).

Differences in catabolism can be observed according to the carbon source used for growth, e.g. glucose or glycerol (Abbad-Andaloussi et al. 1996a). On glucose alone, neither GDH nor 1,3-PPD dehydrogenase activity is detected (Abbad-Andaloussi et al. 1998). On glycerol alone, 57% of the glycerol fermented is diverted through the 1,3-PPD pathway and 43% through the dihydroxyacetone (DHA) pathway. The theoretical maximum 1,3-PPD yield is 72%, assuming that hydrogen and butyric acid are not produced (Zeng et al. 1993). On glucose/glycerol mixtures, when cells are cultivated in batch, glucose has an inhibitory effect on the induction of enzymes for glycerol catabolism. Glycerol is then used mainly to produce 1,3-PPD, resulting in an enhanced yield of 1,3-PPD [up to 0.92 mol mol<sup>-1</sup> (Abbad-Andaloussi et al. 1998), which is in good agreement with previous results of Biebl and Marten (1995)]. This enhancement of the 1,3-PPD yield is obtained whatever the nature of the carbon source of the preculture.

Saint-Amans and Soucaille (1995) studied the influence of glucose as a cosubstrate in glycerol fermentation to 1,3-PPD by *C. butyricum* VPI 3266 in carbon-limited chemostat cultures and obtained a maximum yield of 0.6 mol of 1,3-PPD mol<sup>-1</sup> of glycerol.

Petitdemange et al. (1995) isolated *C. butyricum* E5 which ferments glycerol and produces 1,3-PPD as a major fermentation product, with the concomitant production of acetic and butyric acid. This strain is very resistant to high concentrations of glycerol and 1,3-PPD, at which the strain *C. butyricum* DSM 5431 is completely inhibited. Mutants of *C. butyricum* E5 exhibiting resistance to allyl alcohol produce the same quantities of 1,3-PPD as the wild-type strain, but produce more acetate than

Hassiba Malaoui · Régis Marczak (✉)  
Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram+,  
Domaine scientifique Victor Grignard, Université Henri Poincaré,  
Faculté des Sciences, BP 239,  
54506 Vandoeuvre lès Nancy cédex, France  
e-mail: marczak@lcb.u-nancy.fr  
Tel.: +33-3-83912551, Fax: +33-3-83912550

butyrate. Allyl alcohol resistance can not be attributed to the loss of 1,3-PPD dehydrogenase but has to be regarded as a shift in the reductive properties of the enzyme (Abbad-Andaloussi et al. 1996b).

The objective of this work was to study the cofermentation of glucose/glycerol in chemostat culture by *C. butyricum* E5 and the mutant strain E5-MD in order to compare the effect of glucose on the repartition of carbon flow in the metabolism of glycerol. For each strain, it is then possible to determine the physiological threshold which allows the amount of 1,3-PPD in the culture medium to increase, while maintaining a high conversion rate for glycerol.

## Materials and methods

### Organism and medium

*C. butyricum* E5 and E5-MD, a strain resistant to allyl alcohol, were used (Petitdemange et al. 1995). The spores of the strains were stored at 4 °C in Hungate tubes in reinforced clostridial medium (RCM; Oxoid, Basingstoke, UK). For inoculum preparation, spores were transferred to RCM, heat-shocked at 80 °C for 10 min and incubated at 34 °C under anaerobic conditions in Hungate tubes. The preculture medium contained the following components (per litre of distilled water): 20 g of either glycerol or glucose, 1.0 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.0 g of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 g of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15 mg of  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg of  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.0 g of  $\text{CaCO}_3$ , 1.0 g of yeast extract and 2 ml of trace elements solution SL7 (Biebl and Pfennig 1982). The growth temperature was 34 °C. This medium, without  $\text{CaCO}_3$ , but with either 60 g of glycerol  $\text{l}^{-1}$  or 10 g of glucose  $\text{l}^{-1}$ , was used as the culture medium in the bioreactor.

### Fermentation modes

*C. butyricum* E5 and E5-MD were grown in glycerol-limited continuous culture. The culture was carried out aseptically in a 2-l bioreactor (2-l growth vessel with a 1-l working volume; LSL-Biolafite). The temperature was controlled at 34 °C and the pH at 6.8 with 2 M KOH. Anaerobic conditions were maintained by sparging with nitrogen. Agitation was kept constant at 100 rpm. The culture volume was kept constant at 1 l by automatic regulation of the culture level. The bioreactor was inoculated (10%) with an exponentially growing preculture. First the culture was grown in batch for 6–12 h. Then the continuous culture was started at a dilution rate of 0.08  $\text{h}^{-1}$  with a glycerol input concentration of 10 g  $\text{l}^{-1}$ . Increasing concentrations of glucose (1, 2, 4 and 8 g  $\text{l}^{-1}$ ) were successively added.

### Analytical methods

Glycerol was determined enzymatically by glycerol kinase, pyruvate kinase and L-lactate dehydrogenase enzymes using the Boehringer test kit. Glucose was determined using glucose oxidase (glucose diagnostic kit No. 510; Sigma). Acetate was determined enzymatically by citrate synthase and malate dehydrogenase enzymes using the Boehringer test kit. Concentrations of 1,3-PPD, acetic and butyric acids were determined by gas chromatography (Intersmat IGC 121 FL) equipped with a flame ionization detector. Separation took place in a glass column (2 m long, 2 mm internal diameter) packed with chromosorb 101/80–100 mesh. Nitrogen was used as the carrier gas and *n*-butanol as the internal standard. The temperature of the column was 170 °C and data were analysed with an Intersmat ICRIB integrator. The concentration of residual substrates, glucose and glycerol, and the concentration of 1,3-PPD,

acetic and butyric acids were also determined by using high performance liquid chromatography, after centrifugation of the culture medium for 15 min at 12,000 g and filtration of the supernatant fluid through a nitrocellulose membrane with 0.2- $\mu\text{m}$  pores.

The cell concentrations were estimated as cell dry weights, using a predetermined correlation between cell dry weight and absorbance at 650 nm ( $A_{650}$ ; UV 160A double beam spectrophotometer; Shimadzu, Kyoto, Japan).

### Preparation of cell-free extracts

Cells grown on a glucose/glycerol mixture were harvested by centrifugation at 12,000 g for 15 min and resuspended in Tris buffer sparged with nitrogen (50 mmol Tris-HCl  $\text{l}^{-1}$ , 2.0 mmol DL-dithiothreitol  $\text{l}^{-1}$  and 1 mmol  $\text{MnCl}_2$   $\text{l}^{-1}$ , pH 7.4). The cells were sonicated at 2 °C for 20 s at a frequency of 20 KHz, followed by a pause of 60 s (150 W ultrasonic disintegrator; MSE, UK) and this cycle was repeated four times. The supernatant fluid was collected from the cell lysate by centrifugation at 12,000 g for 20 min at 4 °C. At each step, extracts were maintained under a nitrogen atmosphere. The protein concentration of cell extracts was determined according to the method of Lowry et al. (1951), using crystalline bovine serum albumin as the standard.

### Enzyme assays

GDH (EC 1.1.1.6) and 1,3-PPD dehydrogenase (EC 1.1.1.202) activities were measured by the linear increase in  $A_{340}$  produced by the addition of cell extracts. The assays contained the following components: 100 mmol  $\text{l}^{-1}$  of either glycerol or 1,3-PPD, 2 mmol  $\text{NAD}^+$   $\text{l}^{-1}$ , 30 mmol ammonium sulfate  $\text{l}^{-1}$  and 100 mmol potassium carbonate buffer  $\text{l}^{-1}$ , pH 9.0 (Ruch et al. 1974).

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; EC 1.2.1.12) activity was measured by the linear increase in  $A_{340}$  produced by the addition of cell extracts, according to Ferdinand (1964).

Hydrogenase (EC 1.18.99.1) in the direction of methyl viologen reduction was assayed according to Junelles et al. (1988), modified as follows: 60 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2), 20 mM methyl viologen and 140 mM  $\beta$ -mercaptoethanol under a hydrogen atmosphere.

Glycerol dehydratase (EC 4.2.1.28) activity was determined by the 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) method according to Toraya et al. (1977). The assays contained the following components: 0.2 M 1,2-PPD, 0.05 M KCl, 0.035 M potassium phosphate buffer (pH 7.0), 15  $\mu\text{M}$  adenosylcobalamin and an appropriate amount of cell extract in a total volume of 0.5 ml. After incubation at 37 °C for 10 min, the enzyme reaction was stopped by adding 0.5 ml of 0.1 M potassium citrate buffer (pH 3.6) and a 0.25 ml of 0.1% MBTH hydrochloride. After 15 min at 37 °C, 0.5 ml of water was added and the amount of propionaldehyde was determined from the  $A_{305}$ . The apparent molar extinction coefficient at 305 nm for the coloured product formed from propionaldehyde in the MBTH method was  $13.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### Determination of $\text{NAD}^+$ and NADH pools

Levels of  $\text{NAD}^+$  and NADH were measured after extraction, neutralization and filtration of a culture broth sample. Samples (4 ml) were taken quickly from the bioreactor with sterile syringes and were immediately put into tubes containing the extractant, without separating the cells from the medium.  $\text{NAD}^+$  was extracted with HCl ( $\text{NADH}$  and  $\text{NADPH}$  were degraded) and  $\text{NADH}$  was extracted with KOH (degrading  $\text{NAD}^+$  and  $\text{NADP}^+$ ) as described by Wimpenny and Firth (1972).  $\text{NADH}$  was converted to  $\text{NAD}^+$  with D-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.28; Klingenberg 1965).  $\text{NAD}^+$  was assayed with a  $\text{NAD(H)}$ -specific alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1; Klingenberg 1965; Vasconcelos et al. 1994) and the resulting  $\text{NADH}$  was determined by fluorometry (model F-2000; Hitachi).

**Table 1** Effect of glucose on growth and product formation by wild-type *Clostridium butyricum* E5 during fermentation in continuous culture on glycerol (108.7 mM). Temperature: 34 °C, agitation: 100 rpm, pH 6.8, dilution rate: 0.08 h<sup>-1</sup>. Values represent

the average of three determinations (with standard deviations in parentheses). Yield of 1,3-propanediol ( $Y_{1,3-PPD}$ ) is expressed in moles 1,3-PPD produced per mole glycerol consumed

Glucose input (mM)	Biomass (g l <sup>-1</sup> )	Glucose residual (mM)	Glycerol consumed (mM)	Fermentation products (mM)				$Y_{1,3-PPD}$	Carbon recovery (%)	Acetate/butyrate ratio
				Acetate	Butyrate	1,3-PPD	Total acids			
0.00	1.34 (0.02)	0	66.3 (7.9)	0.00	8.1 (0.8)	41.9 (7.3)	8.1	0.63	95.2	–
5.55	1.10 (0.20)	0	103.8 (1.6)	0.00	17.2 (1.3)	70.9 (4.5)	17.2	0.68	100.6	–
11.1	1.10 (0.21)	0	106.9 (0.2)	1.2 (0.01)	16.6 (0.3)	86.6 (12.1)	17.8	0.81	104.9	0.10
22.2	0.57 (0.16)	0	93.4 (0.5)	3.0 (0.02)	21.5 (0.8)	83.6 (1.8)	24.5	0.89	99.4	0.14
44.4	0.37 (0.05)	3.4(0.2)	35.7 (5.7)	5.2 (0.05)	38.7 (2.7)	29.9 (2.8)	43.9	0.85	94.1	0.13

**Table 2** Effect of glucose on growth and product formation by *C. butyricum* E5 mutant MD strain during fermentation in continuous culture on glycerol (108.7 mM)

Glucose input (mM)	Biomass (g l <sup>-1</sup> )	Glucose residual (mM)	Glycerol consumed (mM)	Fermentation products (mM)				$Y_{1,3-PPD}$	Carbon recovery (%)	Acetate/butyrate ratio
				Acetate	Butyrate	1,3 PPD	Total acids			
0.00	0.60 (0.02)	0	93.3 (3.0)	1.7 (0.2)	20.3 (1.9)	46.8 (1.9)	22.0	0.50	102.3	0.08
5.55	0.61 (0.11)	0	98.3 (7.5)	0.03 (0.01)	18.3 (3.4)	63.6 (1.1)	18.3	0.65	99.3	–
11.1	0.55 (0.02)	0	84.9 (6.0)	0.02 (0.01)	13.8 (1.2)	71.4 (2.5)	13.8	0.84	99.5	–
22.2	1.09 (0.06)	0	87.1 (0.4)	0.20 (0.02)	27.9 (0.7)	67.2 (2.1)	28.1	0.77	98.9	0.01
44.4	0.95 (0.09)	0.3 (0.03)	69.9 (0.4)	8.5 (0.4)	34.7 (0.8)	63.0 (0.3)	43.2	0.90	97.0	0.24

## Results

### Effect of glucose on growth and product formation

The effect of glucose on fermentation in continuous mode of wild-type *C. butyricum* E5 on glycerol (108.7 mM) is shown in Table 1. Cultivated on glycerol alone, the bacterium converted glycerol into 1,3-PPD at a yield of 0.63 mol mol<sup>-1</sup>, in good agreement with Abbad-Andaloussi et al. (1996b). Addition of glucose to the culture medium led to its total consumption up to 22.2 mM. The uptake of glycerol was also favoured in the presence of glucose, although it was never completely exhausted. In parallel, the glycerol conversion to 1,3-PPD increased sharply from 0.63 mol mol<sup>-1</sup> to 0.89 mol 1,3-PPD mol<sup>-1</sup> glycerol. When 44.4 mM glucose was added, residual glucose remained in the culture and only one third of the glycerol provided was metabolized. Also, acid production still increased at the expense of 1,3-PPD with an acetate/butyrate ratio never exceeding 0.14. The highest biomass level was obtained on glycerol as sole carbon source. This level was significantly reduced at glucose inputs of 22.2 mM and 44.4 mM.

The same experiments were carried out with the mutant MD strain (table 2). Similar results were obtained except for a glucose input concentration of 44.4 mM. The progressive addition of glucose to the culture medium up to 44.4 mM increased the yield of 1,3-PPD from 0.50 mol mol<sup>-1</sup> on glycerol alone to a maximum of 0.90 mol 1,3-PPD mol<sup>-1</sup> glycerol. Under these conditions, acid production increased in parallel with glucose

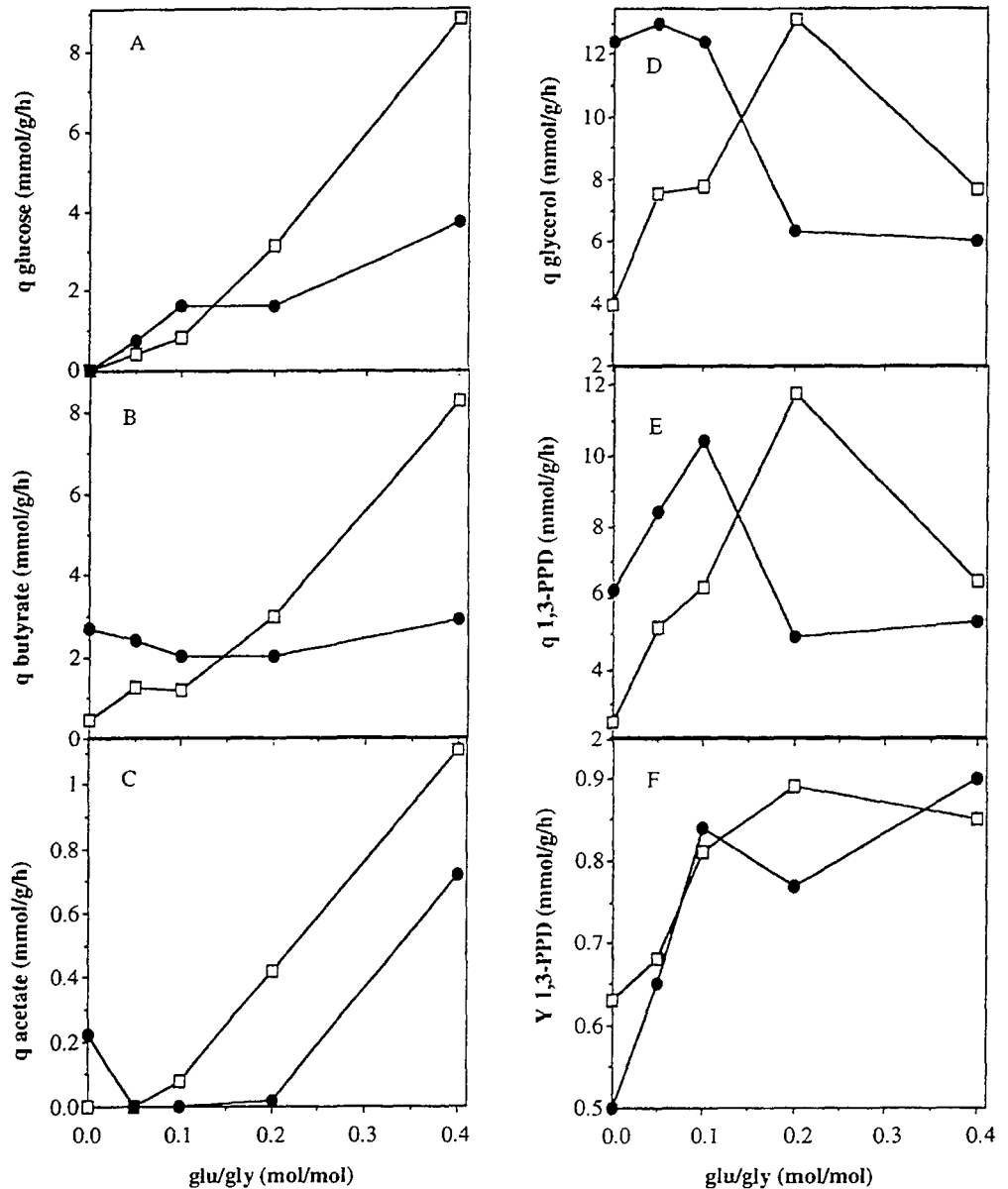
uptake. Acetate was especially favoured when glucose input reached its highest values. At 44.4 mM glucose added, the mutant strain consumed twice as much glycerol as the wild-type strain. Table 2 also indicates that the production of 1,3-PPD by the mutant was always lower than that of the wild type, with respective maxima of 71 mM and 86 mM. The biomass level in the mutant increased slightly at a glucose input of 22.2 mM or above. Differences between the two strains can reflect differences in glucose consumption and the influence of glucose on the repression of their catabolism.

### Effect of glucose on the specific rate of substrate uptake and product formation

The specific rates and yields, calculated from the data in Tables 1 and 2, are presented in Fig. 1 as a function of the glucose/glycerol (glu/gly) molar ratio. In the wild-type *C. butyricum* E5, the specific rate of glucose uptake ( $q_{\text{glucose}}$ ) increased significantly with the increase in the concentration of glucose added to the culture medium. The highest value was obtained for a glu/gly ratio equal to 0.4. In the mutant, the main increase in the specific rate was restricted to a glu/gly ratio equal to or lower than 0.1 (Fig. 1A).

In the wild type, the specific rate of formation of butyrate ( $q_{\text{butyrate}}$ ) followed that of glucose formation, with the highest value given for a glu/gly ratio equal to 0.4. In contrast, this specific rate did not vary significantly in the mutant (Fig. 1B). Similar results were obtained in the wild type for the specific rate of acetate formation. In

**Fig. 1A–F** The specific rate ( $q$ ) of substrate uptake and product formation by the *Clostridium butyricum* wild-type and mutant MD strains as a function of the molar glucose/glycerol ( $glu/gly$ ) ratio. **A** Specific rate of glucose uptake. **B** Specific rate of butyrate formation. **C** Specific rate of acetate formation. **D** Specific rate of glycerol uptake. **E** Specific rate of 1,3-propanediol (1,3-PPD) formation. **F** Yield ( $Y$ ) of 1,3-PPD.  $\square$  Wild-type strain,  $\bullet$  mutant MD strain. All rates are expressed as millimoles per gram of dry cells per hour ( $mmol/g/h$ )



the mutant, acetate production was markedly favoured at the highest  $glu/gly$  ratio (Fig. 1C).

The addition of glucose affected the specific rate of glycerol uptake ( $q_{glycerol}$ ) differently in the two strains (Fig. 1D). In the wild type, the maximum value was obtained for a  $glu/gly$  ratio of 0.2, followed by a marked fall when this ratio doubled. In the mutant, the maximum value was the same as in the wild type, but it was obtained at lower glucose inputs. With a  $glu/gly$  ratio of 0.2, this value was half of that obtained with the wild type.

The specific rate of 1,3-PPD formation ( $q_{1,3-PPD}$ ) followed the fluctuations observed with glycerol for both strains (Fig. 1E). The maximum value observed in the mutant with a  $glu/gly$  ratio of 0.1 was around 15% lower than that observed in the wild type, which is in agreement with the results in Table 1.

The yield of 1,3-PPD ( $Y_{1,3-PPD}$ ) from the wild type increased in the presence of glucose in the culture medium

and reached the maximum value of  $0.89 \text{ mol mol}^{-1}$  for a  $glu/gly$  ratio equal to 0.2. It then decreased slightly to 0.85 for a doubled ratio (Fig. 1F). This can be explained by the fall in the amount of glycerol used at the same time. However, the addition of glucose in the culture medium also led to an increase in the 1,3-PPD yield from the mutant. The maximum value reached was  $0.90 \text{ mol mol}^{-1}$  for a  $glu/gly$  ratio equal to 0.4.

#### Effect of glucose on enzymatic specific rates

Table 3 shows the effect of the glucose concentration in the culture medium on the specific enzymatic activities obtained from crude extracts of wild-type *C. butyricum* E5 cultivated on glycerol in a chemostat. The GDH activity continuously decreased, falling from  $1.25 \text{ UI mg}^{-1}$  of proteins in the absence of glucose down to

**Table 3** Effect of glucose concentration in the culture medium on the enzymatic activity of cell-free extracts from wild-type *C. butyricum* E5 during fermentation in continuous culture on glycerol (108.7 mM). One unit of enzyme activity (UI) is defined

Glucose input (mM)	Glycerol dehydrogenase (UI mg <sup>-1</sup> )	Glycerol dehydratase (UI mg <sup>-1</sup> )	Propanediol dehydrogenase (UI mg <sup>-1</sup> )	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (UI mg <sup>-1</sup> )	Hydrogenase (UI mg <sup>-1</sup> )
0.00	1.25 (0.01)	0.065 (0.001)	0.16 (0.01)	0.20 (0.01)	0.007 (0.001)
5.55	0.83 (0.01)	0.032 (0.001)	0.49 (0.04)	0.27 (0.02)	0.002 (0.001)
11.1	0.53 (0.05)	0.074 (0.003)	0.12 (0.01)	0.66 (0.10)	0.010 (0.002)
22.2	0.37 (0.01)	0.094 (0.003)	0.06 (0.01)	1.51 (0.01)	0.005 (0.001)
44.4	0.10 (0.01)	0.025 (0.001)	0.02 (0.01)	1.84 (0.15)	0.004 (0.001)

**Table 4** Effect of glucose concentration in the culture medium on the enzymatic activity of cell-free extracts from the *C. butyricum* E5 mutant MD strain during fermentation in continuous culture on glycerol (108.7 mM)

Glucose input (mM)	Glycerol dehydrogenase (UI mg <sup>-1</sup> )	Glycerol dehydratase (UI mg <sup>-1</sup> )	Propanediol dehydrogenase (UI mg <sup>-1</sup> )	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (UI mg <sup>-1</sup> )	Hydrogenase (UI mg <sup>-1</sup> )
0.00	0.50 (0.01)	0.015 (0.003)	0.26 (0.04)	0.163 (0.026)	0.151 (0.010)
5.55	0.24 (0.03)	0.016 (0.003)	0.10 (0.01)	0.163 (0.013)	0.011 (0.002)
11.1	0.26 (0.02)	0.049 (0.001)	0.04 (0.01)	0.165 (0.006)	0.022 (0.001)
22.2	0.14 (0.05)	0.005 (0.001)	0.10 (0.02)	0.176 (0.014)	0.002 (0.001)
44.4	0.06 (0.01)	0.009 (0.001)	0.03 (0.01)	0.187 (0.004)	0.048 (0.004)

**Table 5** Effect of glucose concentration on the intracellular nucleotide rate and the oxidation/reduction balance of wild-type *C. butyricum* E5 during fermentation in continuous culture on glycerol (108.7 mM). NADH and NAD<sup>+</sup> concentrations are expressed in micromoles per gram of cells. Standards deviations (from four

determinations) are given in parentheses.  $q_{\text{NADH}}$  is the specific rate of formation of NADH via ferredoxin-NAD reductase, expressed in millimoles per gram of cells per hour. The O/R value is the ratio between oxidized and reduced equivalents

Glucose input (mM)	NADH	NAD <sup>-</sup>	NADH+NAD <sup>+</sup>	NADH/NAD <sup>-</sup>	$q_{\text{NADH}}$	O/R value
0.00	3.76 (0.02)	3.71 (0.04)	7.46	1.01	1.04	0.28
5.55	2.32 (0.01)	1.05 (0.11)	3.37	2.20	2.76	0.33
11.1	3.31 (0.06)	0.66 (0.02)	3.97	5.05	4.73	0.22
22.2	4.81 (0.02)	6.79 (0.02)	11.61	0.71	9.93	0.36
44.4	5.05 (0.02)	1.72 (0.05)	6.77	2.94	4.05	0.73

0.1 UI mg<sup>-1</sup> of proteins with a 44.4 mM glucose input. Since glycerol was less metabolized by the cells (Table 1), its conversion to 1,3-PPD was favoured at the expense of acid formation.

GDH activity reached its highest level in a culture supplemented with 22.2 mM glucose, coinciding with the maximum values for the production and yield of 1,3-PPD.

Increasing glucose inputs also led to a progressive decrease of the 1,3-PPD dehydrogenase activity and to a progressive increase of GAPDH activity. In contrast, the hydrogenase activity never exceeded 0.010 UI mg<sup>-1</sup> of proteins. It became clear that only GDH, 1,3-PPD dehydrogenase and glycerol dehydratase activities were subject to catabolic repression by glucose, since these activities fell at a concentration of 44.4 mM glucose. Under these conditions, glycerol and its metabolic product, DHA, no longer played an inducer role for the *dha* regulon.

Similar tests were carried out with the mutant (Table 4). GDH and 1,3-PPD dehydrogenase were affected in a similar way by increasing glucose inputs. In

contrast, GAPDH remained unaffected by the addition of glucose and allowed complete glucose consumption by the cells. Glycerol dehydratase activity reached its highest level in a culture supplemented by 11.1 mM glucose, coinciding with the maximum production and yield values of 1,3-PPD, as has already been noticed for the wild type with a double glucose concentration. In both cases, the high 1,3-PPD yield obtained from 44.4 mM glucose input could be attributed to low glycerol uptakes rather than to high glycerol dehydratase activity levels.

#### Effect of glucose on the nucleotide rate and the oxidation reduction balance

Table 5 shows the effect of glucose concentration in the culture medium on the intracellular nucleotide rate and the oxidation reduction balance of wild-type *C. butyricum* E5 cultivated on glycerol. The specific rate of NADH production ( $q_{\text{NADH}}$ ) via the activity ferredoxin-NAD reductase was calculated by the difference between the specific rate of consumption ( $q_{\text{NADH cons}}$ ) during the



**Table 6** Effect of the concentration of glucose on the intracellular nucleotide rate and the oxidation reduction balance of *C. butyricum* E5 mutant MD strain during fermentation in continuous culture on glycerol (108.7 mM)

Glucose input (mM)	NADH	NAD <sup>-</sup>	NADH+NAD <sup>-</sup>	NADH/NAD <sup>-</sup>	$q_{\text{NADH}}$	O/R value
0.00	2.86 (0.02)	0.29 (0.03)	3.15	9.78	-0.17	0.48
5.55	3.07 (0.02)	3.28 (0.38)	6.35	0.93	3.82	0.37
11.1	3.12 (0.02)	4.93 (0.05)	8.05	0.63	8.48	0.28
22.2	2.20 (0.03)	1.18 (0.02)	3.39	1.86	2.32	0.49
44.4	2.85 (0.01)	2.52 (0.02)	5.37	1.13	3.92	0.57

formation of products and the specific rate of NADH production ( $q_{\text{NADH prod}}$ ) during the conversion of substrate into pyruvate. Table 5 also shows that this difference was largely positive throughout these experiments and increased regularly up to a maximum of 9.93 mmol g<sup>-1</sup> of cells h<sup>-1</sup> for the culture containing 22.2 mM glucose. It then decreased by half at 44.4 mM glucose. All these values are in agreement with low hydrogenase activity and a ratio between oxidized and reduced equivalents (O/R) lower than 1. The experimental determination of the intracellular nucleotides concentrations showed an excess of NADH compared to NAD<sup>-</sup>, which in most cases is in agreement with the value of  $q_{\text{NADH}}$ .

Table 6 shows the effect of the glucose concentration in the culture medium on the nucleotide rate and the oxidation reduction balance of the *C. butyricum* MD mutant cultivated on glycerol. It must be pointed out that the NADH/NAD<sup>-</sup> ratio of the mutant presented less variation in response to the concentration of added glucose than that of the wild type. The O/R ratios were more uniform with a minimum of 0.28 for a concentration of 11.1 mM glucose. In the mutant strain, the  $q_{\text{NADH}}$  increased with glucose inputs up to 11.1 mM, versus 22.2 mM in the wild-type strain. In both cases, this value fell for a doubled concentration of glucose below the optimum. These fluctuations were parallel in both strains in terms of the  $q_{\text{glycerol}}$  (Fig. 1D) and 1,3-PPD production and yield values (Tables 1 and 2).

## Discussion

*C. butyricum* E5 wild-type and mutant MD strains are able to grow on raw or commercial glycerol (Petitdemange et al. 1995). Besides acetate and butyrate, both strains form 1,3-PPD as the main product of glycerol fermentation. Cofermentations from glucose/glycerol mixtures have been carried out in a chemostat with dilution rate of 0.08 h<sup>-1</sup> in order to improve the 1,3-PPD yield. In *C. butyricum* DSM 5431, this dilution rate allows the glycerol to be fully metabolized, with a 1,3-PPD yield of 0.60 mol mol<sup>-1</sup> (Abbad-Andaloussi et al. 1996a). In our study, this yield increased from 0.63 mol mol<sup>-1</sup> to 0.89 mol mol<sup>-1</sup> for the wild-type *C. butyricum* E5 and from 0.50 mol mol<sup>-1</sup> to 0.84 mol mol<sup>-1</sup> for the *C. butyricum* E5 mutant MD strain, when glucose/glycerol mixtures were used as carbon source. This improvement confirms

the hypothesis that the availability of reducing power is one of the factors limiting the yield of 1,3-PPD from glycerol. However, the yield obtained in *C. butyricum* E5 did not reach the theoretical maximum of 1.0 mol mol<sup>-1</sup>, possibly because NADH from sugar metabolism is not fully accessible to the 1,3-PPD oxidoreductase responsible for 1,3-PPD production and also because glycerol is diverted into other products such as biomass or fermentation byproducts.

Other studies have also shown such improvement: in *Escherichia coli*, the yield of 1,3-PPD from glycerol was improved from 0.46 mol mol<sup>-1</sup> with glycerol alone to 0.63 mol mol<sup>-1</sup> with glucose cofermentation and to 0.55 mol mol<sup>-1</sup> with xylose cofermentation (Tong and Cameron 1992). In anaerobic chemostat cultures of *Lactobacillus reuteri*, glucose/glycerol cofermentation resulted in an increased ethanol production and a decreased lactate production, besides a significant production of 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) and 1,3-PPD (El-Ziney et al. 1998). Biebl and Marten (1995) showed that, for the mixed-substrate culture, 90% of the glycerol was converted to 1,3-PPD and 10% was used for acid production; and enhancement of 1,3-PPD yield by glucose was only obtained when the preculture was grown on glycerol. In batch cultures of *C. butyricum* DSM 5431, with an equimolar mixture of glucose and glycerol, 92% of the glycerol flow was converted through the 1,3-PPD pathway whatever the nature of carbon source for the preculture. In this case, glucose catabolism was used by the cells to produce energy through acetate/butyrate production and NADH, whereas glycerol was mainly used in the absorption of reducing power (Abbad-Andaloussi et al. 1998).

*C. butyricum* E5 wild-type and mutant strains have been grown in a chemostat on glycerol with increasing glucose inputs in order to determine the glucose/glycerol molar ratio allowing the maximum 1,3-PPD yield from glycerol. In this way, both strains have been shown to be able to fully metabolize glucose up to 22.2 mM, corresponding to a glucose/glycerol molar ratio of 0.2 for both the wild-type and mutant strains.

First, the addition of glucose up to a molar glu/gly ratio of 0.2 allowed glycerol to be largely metabolized by both strains in correlation with a progressive increase in production and yield of 1,3-PPD. The parallel evolution of the specific activity of glycerol consumption and the formation of 1,3-PPD shows that the reducing pathway still functions, although glucose exerts an inhibitory

effect on the 1,3-PPD dehydrogenase activity. This can continue to form 1,3-PPD, because the limiting step corresponding to the glycerol dehydratase activity is not significantly influenced by the addition of glucose. The 1,3-PPD yield increases because the addition of glucose in the culture medium gradually diverts the glycerol flow away from the oxidative pathway towards the reducing pathway. Consequently, the GDH activity is progressively reduced. The formation of acids from glucose is also favoured since GAPDH activity is stimulated. The glycerol is then used mainly to consume NADH produced by the latter enzyme, with an optimization of 1,3-PPD production as a consequence. The hydrogenase activity remains very low and does not take charge of the electron flow generated during the formation of the products. However, the specific rate of NADH production shows that, by the activity of ferredoxin-NAD reductase, NADH is produced in excess and this must also be used in order to maintain the oxidation/reduction balance.

Metabolic differences were observed between the two strains, probably resulting from mutagen actions influencing the regulation of biosynthesis or the expression of the activity of several enzymes. Thus the mutant strain generally presents a lower activity glycerol dehydratase which, under the optimal conditions for each of the strains, reaches half of that measured in the wild type. This can explain the lower 1,3-PPD yield realized by this strain, since the dehydration of glycerol into 3-HPA is the limiting step in the production of 1,3-PPD (Abbad-Andaloussi et al. 1996c). Moreover, for the wild-type strain, the reduction in GDH activity and the increase in GAPDH activity are more dependent on the addition of glucose, whereas the mutant strain is less sensitive to these activities. The mutations of strain MD would also affect the production of acetate, since the mutant strain produces more butyrate and less acetate than the wild type.

Second, for a molar glu/gly ratio higher than 0.2, the consumption of glycerol decreases in both strains. Consequently, the production of 1,3-PPD decreases too. Both oxidative and reducing pathways involved in the assimilation of glycerol are blocked, because of the decrease in the activity level of 1,3-PPD dehydrogenase and GDH. These enzymes become limiting steps, since they reach activity values close to those of glycerol dehydratase. These high concentrations of glucose inhibit the enzyme activities of the *dha* regulon, especially 1,3-PPD dehydrogenase, GDH and glycerol dehydratase. Thus their biosynthesis is clearly subject to catabolic repression by glucose. Under these conditions, the glycerol forms less DHA and this no longer induces the biosynthesis of enzymes by the *dha* regulon. The production of acids from glucose increases in both strains, since GAPDH activity is stimulated. However, the mutant strain produces more acetate than the wild type and the acetate/butyrate ratio is higher. This is due to the fact that the mutant strain metabolizes glucose better than the wild type, although glucose is not completely metabolized by either strain.

The wild-type strain is more sensitive to catabolic repression by glucose, because glycerol is less metabolized than it is by the mutant strain. It thus appears that the addition of glucose to the culture medium of *C. butyricum* E5 cultivated in continuous mode optimizes the yield of 1,3-PPD for ratios in substrates lower or equal to 0.2, whereby all glucose is metabolized. Beyond this ratio, a catabolic repression of glycerol assimilation by glucose (Mitchell 1998) and of the biosynthesis of the enzymes coded by the *dha* regulon takes place.

Thus there is a ratio for which the addition of glucose in the culture medium does not block the use of glycerol and both metabolisms adjust each other advantageously according to the criteria of optimal production of 1,3-PPD by cofermentation (Tong and Cameron 1992). This glucose/glycerol molar ratio was established to be 0.2 for the wild type and 0.1 for the mutant.

**Acknowledgments** This work was supported by the Délégation Régionale à la Recherche à la Technologie pour la Région Lorraine (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Paris, France). The authors declare that the experiments comply with the current laws of the country in which the experiments were performed.

## References

- Abbad-Andaloussi S, Durr C, Raval G, Petitdemange H (1996a) Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. *Microbiology* 142:1149–1158
- Abbad-Andaloussi S, Amine J, Gerard P, Petitdemange E (1996b) Properties of allyl alcohol mutants of *Clostridium butyricum* grown on glycerol. *Appl Environ Microbiol* 62:3499–3501
- Abbad-Andaloussi S, Guedon E, Spiecer E, Petitdemange H (1996c) Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1,3-PPD production by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *Lett Appl Microbiol* 22:311–314
- Abbad-Andaloussi S, Amine J, Gerard P, Petitdemange H (1998) Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *J Appl Microbiol* 84:515–522
- Biebl H (1991) Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Appl Microbiol Biotechnol* 35:701–705
- Biebl H, Marten S (1995) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol: use of cosubstrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:15–19
- Biebl H, Pfennig N (1982) Isolation of members of the family Rhodospirillaceae. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (eds) *The procaryotes*. Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp 267–273
- El-Ziney MG, Arneborg N, Uyttendaele M, Debevere J, Jakobsen M (1998) Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous culture. *Biotechnol Lett* 20:913–916
- Ferdinand W (1964) The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochem J* 92:578–585
- Forsberg CW (1987) Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other species. *Appl Environ Microbiol* 53:639–643
- Heyndrickx M, De Vos P, Vancanneyt M, De Ley J (1991) The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212 t2 and *Clostridium pasteurianum* LMG 3285. *Appl Microbiol Biotechnol* 34:637–642

- Junelles AM, Janati-Idrissi R, Petitdemange H, Gay R (1988) Iron effect on acetone-butanol fermentation. *Curr Microbiol* 17: 299–303
- Jungermann K, Thauer RK, Leimenstoll G, Decker K (1973) Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic clostridia. *Biochim Biophys Acta* 305:268–280
- Klingenberg M (1965) Nicotinamide-adenine dinucleotides (NAD, NADP, NADH, NADPH): spectrophotometric and fluorometric methods. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol 4, 2nd edn. Academic Press, New York, pp 2045–2059
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275
- Mitchell WJ (1998) Physiology of carbohydrate of solvent conversion by clostridia. *Adv Microb Physiol* 39:31–130
- Petitdemange E, Dürr C, Abbad-Andaloussi S, Raval G (1995) Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *J Ind Microbiol* 15:498–502
- Ruch FE, Lengeler J, Lin EC (1974) Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 119:50–56
- Saint-Amans S, Soucaille P (1995) Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glucose-glycerol mixture. *Biotechnol Lett* 17:211–216
- Tong T, Cameron DC (1992) Enhancement of 1,3-propanediol production by cofermentation in *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae dha* regulon genes. *Appl Biochem Biotechnol* 34/35:149–159
- Toraya T, Ushio K, Fukui S, Hogenkamp HPC (1977) Studies on the mechanism of the adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction by use of analogs of the coenzyme. *J Biol Chem* 252:963–970
- Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P (1994) Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixture of glucose and glycerol. *J Bacteriol* 176:1443–1450
- Wimpenny JWT, Firth A (1972) Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *J Bacteriol* 111:24–32
- Woods DR (1993) *The clostridia and biotechnology*. (Biotechnology series, vol 25) Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass., pp 1–429
- Zeng AP, Biebl H, Schlieker H, Deckwer WD (1993) Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: regulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme Microbiol Technol* 15:770–779

### 3. CONCLUSION

*Clostridium butyricum* E5 est une bactérie anaérobie stricte, capable de fermenter le glycérol, formant majoritairement du 1,3-PPD, composé à forte valeur ajoutée. Afin d'améliorer le rendement en 1,3-PPD, nous avons mené des expériences en continu de cofermentation sur des mélanges glucose-glycérol. Elles ont montré l'influence du rapport des deux substrats carbonés sur la production du diol recherché. Avec cette étude, nous avons vérifié l'effet positif de l'ajout de glucose sur la production de 1,3-PPD par la souche *C. butyricum* E5 en culture continue. Nous avons également observé qu'au delà d'un seuil correspondant à un rapport molaire glucose/glycérol de 0,2, l'amélioration ne se produit plus et une répression catabolique de l'assimilation du glycérol par le glucose prend place. L'ajout de glucose au milieu de culture de concentration fixe en glycérol, dévie le flux du glycérol de la voie oxydative vers la voie réductrice afin de préserver l'équilibre d'oxydoréduction au sein de la cellule. De plus en plus d'acides sont formés mais essentiellement à partir du glucose. La voie de conversion du glycérol en 1,3-PPD est optimisée dans ces conditions grâce à l'activité de la 1,3-PPD déshydrogénase qui utilise le NADH formé comme cofacteur. Le taux de conversion du glycérol en 1,3-PPD passe alors de 0,63 à un maximum de 0,89 pour la souche sauvage. L'augmentation de la formation du NADH est due en partie à une faible activité hydrogénase. Or des travaux ont montré que des mutants hydrogénase moins provoquaient une production accrue de butyrate et n'optimisaient pas les rendements en 1,3-PPD (Abbad-Andaloussi et coll., 1995). Dans notre cas, il semble que l'ajout de glucose permet d'équilibrer ces deux voies en compétition dans l'utilisation des équivalents réducteurs (figure 7, page 141).

Les mêmes expériences réalisées avec un mutant de la souche E5, appelé E5 MD, résistant à l'alcool allylique ont conduit à des résultats similaires mais avec des taux de conversion en 1,3-PPD en général inférieurs. Le rendement en 1,3-PPD dans ce cas augmente de 0,50 à 0,84 mole/mole. Chez cette souche, la biosynthèse des enzymes du métabolisme du glycérol semble être moins soumise à la répression induite par la présence de glucose. Les résultats obtenus pour les deux souches ont également montré l'influence du glucose sur la biosynthèse des enzymes codées par le régulon *dha*, propre au métabolisme du glycérol chez cette bactérie. On observe notamment une diminution de l'activité glycérol déshydrogénase et une augmentation de l'activité glycérol déshydratase pour des rapports glucose/glycérol inférieurs à 0,2, au delà desquels une répression de la biosynthèse de ces

enzymes et donc de l'utilisation du glycérol intervient. Cette diminution de l'activité glycérol déshydrogénase est avantageuse pour la synthèse de 1,3-PPD puisque le glucose dévie alors le flux de glycérol vers la voie du diol recherché.

Nous avons donc pu déduire pour chaque souche, en fonction de l'évolution de la réponse du métabolisme de la bactérie au changement du taux de réduction du milieu de culture, les rapports glucose/glycérol les plus appropriés dans les conditions étudiées permettant de dévier le flux de glycérol vers une optimisation de la production de 1,3-propanediol. Ce rapport molaire glucose/glycérol est de 0,2 pour la souche sauvage et de 0,1 pour le mutant.

---

### Partie 3: PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA 1,3-PROPANEDIOL DESHYDROGENASE ET DE LA GLYCEROL DESHYDROGENASE CHEZ *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* E5

---

#### 1. INTRODUCTION

Dans la partie précédente nous avons essayé d'améliorer le rendement en 1,3-PPD par voie biotechnologique et génie métabolique (ajout de glucose). Deux enzymes à savoir la 1,3-propanediol déshydrogénase et la glycérol déshydrogénase sont particulièrement dignes d'intérêt puisqu'elles influencent la formation de 1,3-PPD. Nous avons recherché à purifier ces deux enzymes en mettant en œuvre des étapes communes y compris des étapes chromatographiques et électrophorétiques.

Les enzymes clés de la fermentation du glycérol chez *C. butyricum* sont la glycérol déshydrogénase et la dihydroxyacétone kinase pour la voie oxydative et la glycérol déshydratase et la 1,3-propanediol déshydrogénase pour la voie réductrice. Ces quatre enzymes sont codées par le régulon *dha* dont l'expression est induite en présence de dihydroxyacétone ou de glycérol.

La 1,3-propanediol déshydrogénase (EC 1.1.1.202) est l'enzyme qui catalyse la conversion du 3-HPA en 1,3-propanediol, le produit final de la fermentation du glycérol. Cette enzyme est très importante car elle permet d'éviter l'accumulation intracellulaire du 3-HPA, produit toxique. Elle a été purifiée pour la première fois par Johnson et Lin (1987) à partir de *K. pneumoniae*. Depuis, cette enzyme a été purifiée à partir de *L. buchneri* et *L. brevis* (Veigada-Cunha et Foster, 1992), *L. reuteri* (Talarico et coll., 1990), *C. freundii* (Daniel et coll., 1995a) et *C. pasteurianum* (Luers et coll., 1997).

La glycérol déshydrogénase (glycérol: NAD<sup>+</sup> oxydoréductase, EC 1.1.1.6) catalyse l'oxydation du glycérol en dihydroxyacétone. Elle a été purifiée pour la première fois par Ruch et coll., 1980 à partir de *K. aerogenes*. Depuis, cette enzyme a été purifiée à partir de *Bacillus megaterium* (Scharschmidt et coll., 1983), *Schizosaccharomyces pombe* (Marshall et coll., 1985), *Bacillus stearothermophilus* (Spencer et coll., 1989) et *C. freundii* (Daniel et coll., 1995b).

Dans notre étude nous avons purifié et caractérisé ces deux enzymes chez *C. butyricum* E5 vu leur importance physiologique dans le métabolisme du glycérol. La purification de ces déshydrogénases est un passage obligé avant d'utiliser les techniques du génie génétique permettant la production commerciale du 1,3-PPD.

## **2. RESULTATS**

### **2.1. La 1,3-propanediol déshydrogénase**

Les résultats des expériences de l'étude de la purification et la caractérisation de la 1,3-propanediol déshydrogénase chez *C. butyricum* E5 sont présentés dans l'article intitulé: "Purification and characterization of the 1-3-propanediol dehydrogenase of *Clostridium butyricum* E5.

# Purification and characterization of the 1-3-propanediol dehydrogenase of *Clostridium butyricum* E5

Hassiba Malaoui, Régis Marczak\*

Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram+, Domaine scientifique Victor Grignard, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre lès Nancy Cédex, France

Received 16 March 2000; received in revised form 13 March; accepted 4 April 2000

## Abstract

1-3 PPD dehydrogenase (EC 1.1.1.202) was purified to homogeneity from *Clostridium butyricum* E5 grown anaerobically on glycerol in continuous culture. The native enzyme was estimated by gel filtration to have a molecular weight of  $384\,200 \pm 31\,100$  Da; it is predicted to exist as an octamer or a decamer of identical molecular weight subunits. When tested as a dehydrogenase, the enzyme was most active with 1-3 propane diol. In the physiological direction, 3-hydroxypropionaldehyde was the preferred substrate. The apparent  $K_m$  values of the enzyme for 3-hydroxypropionaldehyde and NADH were 0.17 mM and 0.06 mM, respectively. The enzyme requires only  $Mn^{2+}$  for full activity. The enzyme was found to have properties similar to those reported for *Klebsellia pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, and *Clostridium pasteurianum*. © 2000 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Glycerol fermentation; Propane diol dehydrogenase purification; 3-hydroxypropionaldehyde; *Clostridium butyricum*

## 1. Introduction

Glycerol is available in large quantities as one of the products of saponification. It serves as a chemical feed stock for various purposes and is also available as a substrate for biotechnological processes. One product that can be readily manufactured from glycerol is 1,3-propanediol (1,3-PPD). Glycerol fermentation into 1,3-PPD was studied with facultative anaerobic microorganisms of the genera *Klebsiella* and *Citrobacter* [1] and with strictly anaerobic bacteria such as *Clostridium* [2].

*Clostridium butyricum*, a strictly anaerobic spore-forming bacterium is known as a classical acid producer and usually ferments carbohydrates to butyrate, acetate, carbon dioxide, and molecular hydrogen. The production of acetate or butyrate constitutes an important branch point of glycerol fermentation. *C. butyricum* is also able to catabolize glycerol using additional branch point. Indeed glycerol can be either oxidized by an NAD-linked glycerol dehydrogenase (dha D) to dihydroxyacetone (DHA) and subsequently phosphorylated to yield DHAP by dihydroxyacetone kinase

(dha K) and funnelled to the central metabolism, or it can be dehydrated to 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) by co-enzyme B12-dependent glycerol dehydratase (dha B). The latter compound is then reduced to 1,3-PPD by the NADH-linked 1,3-PPD dehydrogenase (dha T). The key enzymes of glycerol fermentation are glycerol dehydrogenase and dihydroxyacetone kinase for oxidative branch and glycerol dehydratase and propanediol dehydrogenase for the reductive branch. The enzymes glycerol dehydrogenase, diol dehydratase, and 1,3-PPD dehydrogenase constitute the branch point that partitions the carbon flux between the competing pathways, i.e. formation of either 1,3-PPD or pyruvate [3]. The four key enzymes of this pathway are encoded by the dha regulon, the expression of which is induced when DHA or glycerol is present [4,5].

1,3-propanediol oxidoreductase (1,3-propanediol dehydrogenase, EC 1.1.1.202) was originally detected in extracts of glycerol-grown cells as an enzyme that catalyzes the oxidation of NADH at the expense of 3-HPA [6]. In contrast to the 1,3-PPD-forming enteric bacteria, only little is known about the enzymes responsible for glycerol breakdown by clostridia. The activities of glycerol dehydrogenase, glycerol dehydratase, and 1,3-PPD dehydrogenase have been determined in crude extracts of *C. butyricum* [7] and the latter activity in *C. pasteurianum* [8]. It is most likely that

\* Corresponding author. Tel.: +33/3-83-91-25-51; fax: +33/3-83-91-25-50.

E-mail address: marczak@lcb.u-nancy.fr (R. Marczak).



glycerol catabolism by *C. butyricum* requires 1.3-PPD dehydrogenase activity to avoid intracellular accumulation of 3-HPA a very toxic compound [9]. 1.3-PPD dehydrogenases have been purified in *Klebsiella pneumoniae* [10], *Lactobacillus buchneri*, and *L. brevis* [11], *L. reuteri* [12], and *Citrobacter freundii* [13]. The entire *dha* regulon of *C. freundii* have been cloned and expressed in *Escherichia coli* [14]. Recently, the genes encoding glycerol dehydratase and 1.3-PPD dehydrogenase of *C. pasteurianum* have been cloned and expressed in *E. coli* and the sequence of the *dha* T gene have been determined [15]. Our present study deals with *C. butyricum* E5, a clostridial strain able to grow as well on the crude glycerol derived from the rapeseed oil transesterification process as it does on glycerol obtained from commercial sources [16]. The purification and the characterization of the 1.3-PPD dehydrogenase from this strain was carried out as preliminary to genetic engineering in order to derive full benefit from a biological process for the commercial production of 1.3-PPD.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Organism and medium

*C. butyricum* E5 was used [16]. The spores of this strain were stored at 4°C in RCM medium (Reinforced Clostridial Medium purchased from Oxoid). The preculture medium contained per liter of deionized water the following components: glycerol, 20 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.0 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 15 mg; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 mg; CaCO<sub>3</sub>, 2.0 g; yeast extract, 1.0 g; trace element solution SL7 [17], 2 ml. The growth temperature was 34°C. This medium, without CaCO<sub>3</sub> and with 60 g/l of glycerol, was used as the culture medium in the bioreactor.

### 2.2. Fermentation modes

*C. butyricum* E5 was grown in glycerol limited continuous culture. The continuous culture was carried out aseptically in 2-L bioreactor (LSL-Biolafite, 2-L growth vessel with a 1-L working volume). The temperature was controlled at 34°C and the pH at 6.8 with 2M KOH. Anaerobic conditions were maintained by sparging with nitrogen. Agitation was kept constant at 100 rev./min. The culture volume was kept constant at 1 liter by automatic regulation of the culture level. The bioreactor was inoculated (10%, v/v) with exponential preculture. The culture was grown in batch for 12 h, and then the continuous culture was started with glycerol input concentration of 10 g/l at a dilution rate of 0.08 h<sup>-1</sup>.

### 2.3. Enzyme assays

The activity of 1.3-PPD dehydrogenase (EC 1.1.1.202) was assayed by monitoring the A<sub>340</sub> at 37°C in a

SHIMADZU UV-160A spectrophotometer equipped with Haake D1 circulating water bath to control the sample cell temperature. The assay mixture contained 100 mM 1.3-PPD, 2 mM NAD<sup>+</sup>, 30 mM ammonium sulfate, and 100 mM potassium carbonate buffer (pH 9.7) in a 1 ml final volume.

One unit of enzyme activity was the amount catalyzing the formation of 1 μmol of product per min under the specified conditions.

### 2.4. Enzyme purification

All purification steps were carried out at 4°C under anaerobic conditions, and the buffer used was 20 mM potassium phosphate buffer (KPB, pH 7.4) containing 1 mM MnCl<sub>2</sub> and 2 mM DTT (buffer A) unless otherwise stated.

#### 2.4.1. Preparation of cell extracts

Cell grown on 10 g/l glycerol from a continuous culture were centrifuged at 12 000 × g for 15 min; after washing with buffer A, cells were resuspended in the same buffer. Cells were sonicated at 2°C for 20 s at a frequency of 20 kHz, followed by a 60 s pause (MSE, 150 watt ultrasonic disintegrator); this cycle was repeated 4×. The supernatant fluid was collected from the cell lysate by centrifugation at 12 000 × g for 20 min at 4°C. At each step, extracts were maintained under anaerobic conditions.

Protein concentrations of cell extracts were determined according to the Bradford's method [18], using crystalline bovine serum albumin as the standard.

#### 2.4.2. Anion exchange chromatography

The supernatant fraction of the cell extract from *C. butyricum* was loaded onto Q Sepharose ion exchange cartridges (3 × 5 ml) connected to the Low Pressure Chromatography Bio-Rad Econo system. The cartridges were first equilibrated then washed with 45 ml of buffer A. The proteins were eluted with the same buffer supplemented with 1 M KCl (buffer B) using a linear gradient of 0 to 1 M KCl (flow rate, 1 ml/min). Fractions (4 ml) were collected and immediately assayed for 1.3-PPD dehydrogenase activity. Proteins were detected by measuring the optical density at 280 nm. Active fractions were pooled and concentrated 6-fold on centrifugal ultrafilters membranes 20 000 molecular weight cut-off (Poly labo).

#### 2.4.3. Gel filtration

A part of the concentrated enzyme sample eluted from Q sepharose was applied through a 0.2 ml injection loop on a high resolution (HR 10/30) column of Superose 12 (10 × 300 mm) of the Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) Pharmacia system. The column was equilibrated with 50 mM KPB (pH 7.4) containing 100 mM KCl and 2mM DTT (flow rate, 0.5 ml/min). The active fractions were eluted with the same buffer and used for characterization of the enzyme.

### 2.5. Molecular mass determinations

Molecular weight of the native enzyme was determined by two methods:

1. Gel filtration on a FPLC column of superose 12 HR 10/30 equilibrated with 50 mM KPB (pH 7.4) containing 100 mM KCl. Column was calibrated with known molecular weight standards (Da) (Sigma, St. Louis, MO, USA): blue dextran (2 000 000), apoferritin (443 000), alcohol dehydrogenase (150 000), human serum albumin (67 000), ovalbumin (45 000), cytochrome C (12 400).
2. Electrophoresis under nondenaturing conditions was carried out on 5% slab gels in Tris-glycine buffer (pH 8.3). Activity staining of 1.3-PPD dehydrogenase was performed as described by Boenigk [19] using crude extract of *C. pasteurianum* [15] and alcohol dehydrogenase as enzyme markers. For calculation of the native molecular mass, a high molecular-mass calibration kit of standard proteins was used (Da) (Sigma): thyroglobulin (669 000), apoferritin (443 000),  $\beta$  amylase (200 000), alcohol dehydrogenase (150 000). Proteins bands were located by staining with blue Coomassie.

The subunit size was estimated by submitting a part of the active protein fraction eluted from gel filtration to polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions. Electrophoresis was carried at room temperature. The samples were diluted 2 $\times$  in SDS gel-loading buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue and 20% glycerol, boiled for 5 min, loaded into the well of a 12% denaturing gel, and subjected to electrophoresis with molecular weight standards (Bio-Rad) for approximately 45 min at a constant voltage of 200 volts. The following proteins were served as subunit molecular weight standards: conalbumin (76 000), albumin (66 200), actin (43 000), GAPDH (36 000), carbonic anhydrase (31 000), trypsin inhibitor (21 500), myoglobin (17 500). Proteins bands were located by staining with blue Coomassie.

### 2.6. Determination of the N-terminal amino acid sequence

The analysis was performed by the protein sequencing device of the Henri Poincaré University (Nancy, France).

After SDS-polyacrylamide electrophoresis of the purified enzyme and blotting onto a PVDF membrane (Proisorb), amino acid sequence analysis was performed on a 476 A microsequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) with on-line identification of the phenylthiohydantoin derivatives.

The N-terminal amino acid sequence was determined by the use of the 610 A Data Analysis System (ABI).

### 2.7. Determination of the optimum pH

Assays to determine the optimum pH were performed with 0.2M KPB adjusted to the appropriate values with 3M

KOH or 3M HCl. DL-Gld and 3-HPA were reduced in the presence of 0.37 mM NADH (10 mM DL-Gld or 3.5 mM 3-HPA was used). 1.3-PPD and glycerol were oxidized in the presence of 2 mM NAD<sup>+</sup> (100 mM 1.3-PPD or glycerol were used). The optimum pH values were calculated by nonlinear regression to the Bell-Shaped Double pKa equation by use of the Curve Fit feature of the program Grafit (Erithacus Software).

### 2.8. Determination of kinetic parameters

The apparent  $K_m$  values obtained with substrates and coenzymes were determined at 37°C with potassium carbonate buffer (pH 9.7 for the oxidative reactions and pH 9.1 for the reductive reactions). They were determined from the results of experiments in which a fixed concentration of the substrate or coenzyme and an appropriate range of concentrations of the other reactant were used.

The  $K_m$  value was expressed in millimolar and calculated by nonlinear regression to the Michaelis–Menten equation by use of the Curve Fit feature of the program Grafit.

### 2.9. Determination of substrate specificity

The activity of 1.3-PPD dehydrogenase in oxidation reactions was determined at 37°C spectrophotometrically at 340 nm by the initial rate of substrate-dependent NADH increase. The assay mixture contained 100 mM KCO<sub>3</sub> buffer (pH 9.7), 30 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM NAD<sup>+</sup>, and 100 mM substrate in a 1-ml final volume. Activities were expressed relative to those obtained with 1.3-PPD.

The enzyme activity in reduction reactions was determined under the same assay conditions described in oxidation reactions, except that the assay mixture contained 100 mM KCO<sub>3</sub> buffer (pH 9.1), 30 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.37 mM NADH, and 10 mM substrate in a 1-ml final volume. Activities are expressed relative to those obtained with 3-HPA.

### 2.10. Determination of the effect of mono and divalent cations

The chloride salts of ammonium, sodium, potassium, magnesium, or lithium (10 mM) and iron, manganese or calcium (1 mM) were included with 100 mM 1.3-PPD, 2 mM NAD<sup>+</sup>, and 100 mM carbonate buffer (pH 9.7) to determine the effects of these cations on enzyme activity.

## 3. Results

### 3.1. Enzyme purification

1.3-PPD dehydrogenase was purified from *C. butyricum* E5 by the procedure detailed in Section 2. The oxidoreductase believed to be responsible for the reduction of 3-HPA to 1.3-PPD was passed over a Q Sepharose ion exchange

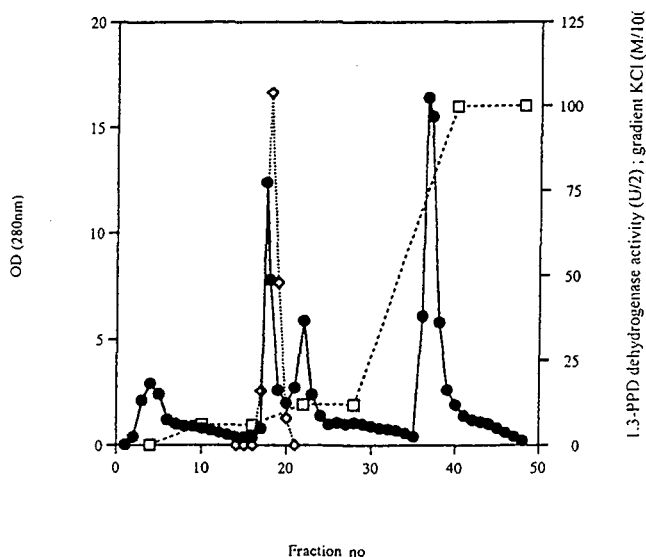


Fig. 1. Elution profile of 1.3-PPD dehydrogenase activity of *C. butyricum* E5 from Mono Q column. The column was developed with a gradient of potassium chloride in buffer B (□). The optical density (OD) at 280 nm (●) was determined for each fraction. 1.3-PPD dehydrogenase activity (○) was expressed in Section 2.

cartridges, proteins with 1.3-PPD dehydrogenase activity were found in fractions eluted with 0.12M KCl (Fig. 1). Active fractions of 1.3-PPD dehydrogenase eluted from Q Sepharose were pooled and concentrated 6-fold, then passed over a Superose 12 HR 10/30 column, to separate proteins in function of their molecular weight. The enzyme was eluted as a single peak (Fig. 2). A summary of the purification protocol is presented in Table 1, the 1.3-PPD dehydrogenase from *C. butyricum* E5 was purified 11-fold with a 38% recovery.

The enzyme was stable at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 5 days and at  $-80^{\circ}\text{C}$  for several weeks under anaerobic conditions.

### 3.2. Molecular mass determination and subunit composition

The native molecular weight of the purified 1.3-PPD dehydrogenase calculated by gel filtration on a fast protein liquid chromatography column was  $384\,200 \pm 31\,000$  Da. Crude extract of *C. butyricum* E5 when subjected to non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis showed a single activity stained band exhibiting the same electrophoresis mobility that the band obtained from crude extract of *C. pasteurianum*. The native molecular mass of the 1.3-PPD dehydrogenase can, therefore, be estimated to 440 000 by this method [15]. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the denatured enzyme exhibited a single major band with a molecular weight of  $48\,750 \pm 4500$  Da (Fig. 3). These results suggest that the native enzyme exists as an octamer or a decamer of this subunit.

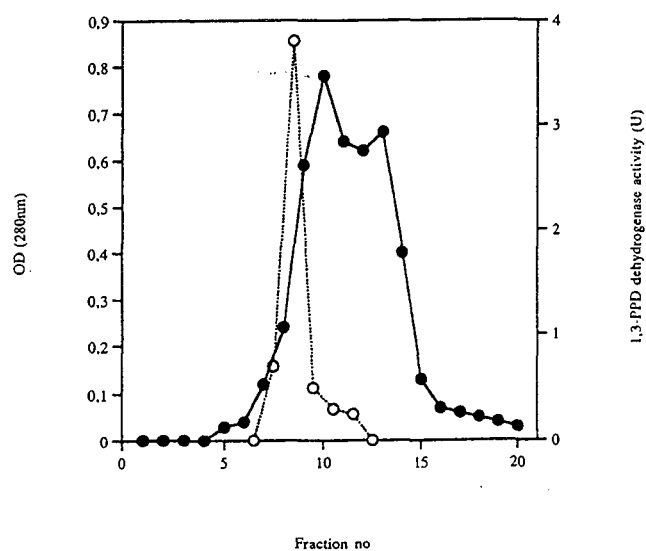


Fig. 2. Elution profile of 1.3-PPD dehydrogenase activity of *C. butyricum* E5 from Superose 12 HR 10/30 column. The column was developed in 50 mM KPB buffer. The optical density (OD) at 280 nm (●) was determined for each fraction. 1.3-PPD dehydrogenase activity (○) was expressed in Section 2.

### 3.3. N-terminal amino acid sequence

The N-terminal amino acid sequence of the purified enzyme from *C. butyricum*, depicted in Fig. 4, was compared with amino acid sequences from alcohol dehydrogenases available in the NCBI databases. It revealed 83% identity (10 out of 12 residues) with the N-terminal amino acid sequences of the 1.3-PPD dehydrogenase of *K. pneumoniae* and *C. freundii* and 78% (11 out of 14 residues) with the N-terminal amino acid sequence of the 1.3-PPD dehydrogenase of *C. pasteurianum*.

### 3.4. Effect of pH

The enzyme exhibited Bell-Shaped Double pKa kinetics. The oxidation of 1.3-PPD proceeded most rapidly at  $\text{pH } 9.7 \pm 0.2$ , whereas the reduction of 3-HPA exhibited the highest level at  $\text{pH } 9.1 \pm 0.4$ . Concerning the nonphysiological substrates (glycerol and Gld), the optimum pH values were under pH 9.0, i.e.  $8.5 \pm 1.9$  for glycerol and  $7.1 \pm 0.2$  for Gld.

### 3.5. Substrate specificity and kinetic properties

Substrate specificity studies showed that 1.3-PPD dehydrogenase was capable of catalyzing a number of oxidation and reduction reactions (Table 2). Unlike many  $\text{NAD}^+$ -linked enzymes, the oxidoreductase exhibited stringent specificity; it catalyzed the oxidation of 1.3-PPD that resulted in the fastest reaction rate. Among the other primary alcoholic groups tested only glycerol and to a smaller extent 1-butanol were oxidized with a significant activity. No sig-

Table 1  
Purification steps of 1,3-propanediol dehydrogenase from *C. butyricum* E5<sup>a</sup>

Steps	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude extract	115.2	99	0.86	1	100
Anion exchange chromatography	46.1	83	1.8	2.1	83.8
Gel filtration	0.41	3.8	9.3	10.8	38.4 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> The purification procedure is described in Section 2.

<sup>b</sup> The recovery was estimated by taking into account the sample volume injected (0.2 ml) versus the total volume obtained after ultrafiltration (2 ml).

nificant activity was detected with 1,2-propanediol, glycerol, 2,3-butanediol, ethylene-glycol, 2-propanol, glycerol-3-P. The reduction reaction was less specific. The enzyme was most active with 3-HPA but considerably less active with acetaldehyde, DHA, DL-Gld, and propionaldehyde (in that order of decreasing relative activity). No reduction of N-butyraldehyde was detected.

The apparent  $K_m$  values determined for various reactions catalyzed by this enzyme are summarized in Table 3. The enzyme exhibited Michaelis–Menten kinetics, the  $K_m$  values for NADH were approximately equivalent in the presence of either substrate (DL-Gld and 3-HPA). The  $K_m$  values for 3-HPA was 7-fold less than for DL-Gld and 20-fold less than for 1,3-PPD. This result showed that the affinity of the enzyme for its physiological substrate (3-HPA) is considerably higher than for DL-Gld and 1,3-PPD.

### 3.6. Effect of enzyme by mono and divalent cations

With respect to cations effect, the purified enzyme from *C. butyricum* exhibited the highest levels of activity (measured as the oxidation of 1,3-PPD) in the presence of 1 mM  $Mn^{2+}$ . Replacement of  $Mn^{2+}$  by other mono or divalent cations such as 10 mM  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ , or 1 mM  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  involved a 60 to 90% reduction of the relative activity. Among the cations tested, only  $Mn^{2+}$  stimulated the activity of 1,3-PPD dehydrogenase from *C. butyricum*.

## 4. Discussion

The 1,3-PPD dehydrogenase purified from *C. butyricum* was found by gel filtration to have a molecular mass of 384 200 Da. Activity staining of 1,3-PPD dehydrogenase on nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis indicated a molecular mass of 440 000 Da similar to the *C. pasteurianum* enzyme. Based on the denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, the enzyme could contain eight identical subunits with molecular weight of 48 750 Da. Based on the 78% homology with *C. pasteurianum* enzyme and *dhaT* deduced gene product, the enzyme could also be a decamer of a polypeptide of 41 776 Da [15]. 1,3-PPD dehydrogenases have been purified from *L. brevis*, *L. buchneri* [11], *L. reuteri* [12], *K. pneumoniae* [10], *C. freundii* [13], and *C. pasteurianum* [15]. Molecular masses reported for the native enzyme are 180 000 Da for the *L. reuteri* enzyme, 440 000 Da for the *C. pasteurianum* enzyme, and around 350 000 Da for the other three enzymes. The molecular mass of the subunits varied between 41 000 Da and 46 000

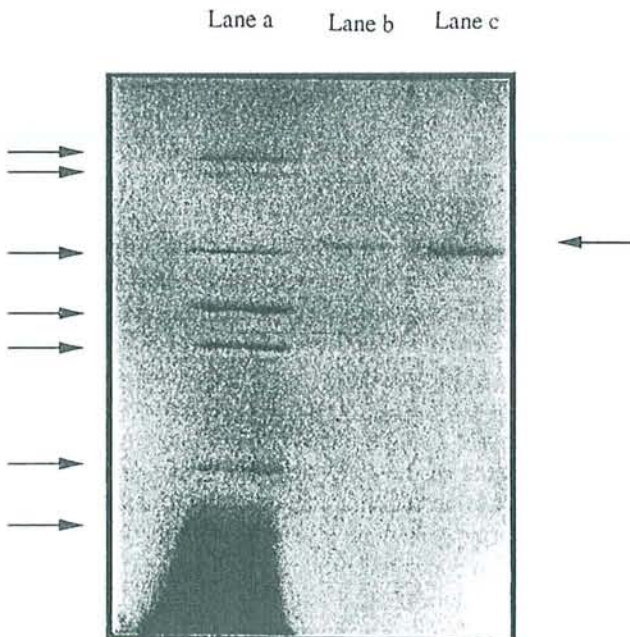


Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of purified 1,3-PPD dehydrogenase. The purified protein was subjected to electrophoresis on a 12% polyacrylamide slab gel in the presence of 10% SDS. The proteins bands were stained with blue Coomassie. Lanes: a. molecular mass markers top to the bottom (conalbumin, 76 000; bovine serum albumin, 66 200; actin, 43 000; GAPDH, 36 000; carbonic anhydrase, 31 000; trypsin inhibitor, 21 500; myoglobin, 17 500); b and c. 2.05 and 4.10  $\mu$ g of the purified 1,3-PPD dehydrogenase, respectively.

MSYRMFDYLVPNVN	<i>K. pneumoniae</i>
MSYRMFDYLV PANVN	<i>C. freundii</i>
M . . RMYDFLAPNVNFM	<i>C. pasteurianum</i>
M . . RMYDYLVPSVNFM	<i>C. butyricum</i>

Fig. 4. N-terminal amino acid sequences alignment (12 to 14 amino acids) of the 1,3-PPD dehydrogenases purified from some strains of *Enterobacteria* and *Clostridia*.

Table 2  
Substrate specificity of 1,3-propanediol dehydrogenase from *C. butyricum* E5

Reactions and substrates	Relative activity (%) <sup>a</sup>
Reduction by NADH	
3-Hydroxypropionaldehyde	100
Acetaldehyde	6.2
Dihydroxyacetone	5.9
DL-Glyceraldehyde	2.9
Propionaldehyde	2.6
N-Butyraldehyde	0
Oxidation by NAD <sup>+</sup>	
1,3-Propanediol	100
1-Butanol	8.1
1,2-Propanediol	<1
Glycerol	28.0
2,3-Butanediol	<1
Ethylene glycol	0
2-Propanol	0
Glycerol-3-P	0

<sup>a</sup> Relative activities for oxidation and reduction of substrates were determined as described in Section 2.

Da. The 1,3-PPD dehydrogenases are predicted to exist as a tetramer for *L. reuteri*, as a hexamer or an octamer for *K. pneumoniae*, as an octamer for *L. brevis*, *L. buchneri*, *C. freundii*, and as a decamer for *C. pasteurianum* of identical subunits. In addition, we found similarity between the N-terminal amino acid sequence of the 1,3-PPD dehydrogenase of *C. butyricum* and those of *K. pneumoniae*, *C. freundii*, and *C. pasteurianum*. The highest homology was found with *C. pasteurianum* enzyme, because we obtained an alignment of 11 out of 14 amino acids.

The substrate specificity of the 1,3-PPD dehydrogenase of *C. butyricum* in the physiological direction, was not absolute for its physiological substrate (3-HPA). The enzyme retained between 2 to 6% activity with other aldehydes such as acetaldehyde, DHA, DL-Gld, and propionaldehyde. Of particular significance was the observation that 3-HPA was rapidly reduced by this enzyme, because 1,3-PPD dehydrogenase is believed to be responsible for the reduction of 3-HPA to 1,3-PPD during growth in the presence of glycerol [13]. Like the enzyme from *C. butyricum*,

Table 3  
Determination of  $K_m$  values for substrates and coenzymes of the 1,3-propanediol dehydrogenase

Substrate or Coenzyme tested	Other reactant	$K_m$ (mM) <sup>a</sup>
1,3-PPD	2 mM NAD <sup>+</sup>	3.55 (0.72)
NAD <sup>+</sup>	100 mM 1,3-PPD	0.20 (0.04)
DL-Glyceraldehyde	0.37 mM NADH	1.18 (0.36)
NADH	10 mM DL-glyceraldehyde	0.08 (0.03)
3-HPA	0.37 mM NADH	0.17 (0.02)
NADH	3.5 mM 3-HPA	0.06 (0.01)

<sup>a</sup>  $K_m$  values were determined as described in Section 2.

Standard deviations (of three determinations) are given in parentheses.

the 1,3-PPD dehydrogenase from *C. freundii* was also most active with 3-HPA and considerably less active with other aldehydes. In contrast, the 1,3-PPD dehydrogenase from *L. reuteri* reduced at a similar rate the corresponding aldehydes, DHA, hydroxyacetone, and 3-HPA [12].

The nonphysiological direction of the enzyme was more specific with 1,3-PPD as a substrate, but among the other primary alcoholic groups tested only glycerol and to a smaller extent 1-butanol acted on with significant activity. Therefore, only glycerol (28%) can be considered as an alternative substrate whereas much lower activities with other substrates could also be the result of slight residual contamination. The same specificity was found for the *K. pneumoniae* enzyme, whereas *C. freundii*, *L. buchneri*, and *L. brevis* enzymes also oxidized n-propanol, n-butanol, and 1,4-butanediol to their corresponding aldehydes, in addition to 1,3-PPD that displayed the highest reaction rate.

In contrast, the 1,3-PPD dehydrogenase from *L. reuteri* exhibited the highest activity for substrates that have adjacent hydroxyl functionality such as glycerol and 1,2-PPD. 1,3-PPD was oxidized at approximately 5% of the maximal rate observed for the latter substrates [12].

The apparent  $K_m$  value for the physiological substrate 3-HPA was 0.17 mM for the 1,3-PPD dehydrogenase from *C. butyricum*. This low value means a high affinity of the enzyme for 3-HPA that could be rapidly oxidized into 1,3-PPD thus preventing its accumulation and any deleterious effect. Indeed, 3-HPA is a very toxic compound as already reported for the 1,3-PPD dehydrogenase of *C. freundii* that exhibits a  $K_m$  value of 0.14 mM [13].

In contrast, the 1,3-PPD dehydrogenase from *L. reuteri* displayed a high  $K_m$  value for 3-HPA of 7.8 mM suggesting that *L. reuteri* seems to be unique for its ability to accumulate and excrete 3-HPA in the culture medium [20,21].

The 1,3-PPD dehydrogenase from *C. butyricum* was preferentially activated only by Mn<sup>2+</sup> like enzymes from *K. pneumoniae*, *L. buchneri*, and *L. brevis* that required either by Mn<sup>2+</sup> or Fe<sup>2+</sup> for full activity. *C. freundii* dehydrogenase as well as over produced enzyme of the recombinant *E. coli* were preferentially activated by an other divalent cation, i.e. Fe<sup>2+</sup> [13].

In contrast, the *L. reuteri* enzyme was reported to require only a monovalent cation, i.e. K<sup>+</sup> for full activity [12]. The ion requirement of 1,3-PPD dehydrogenase from *C. pasteurianum* enzyme has not yet been determined but iron limitation during growth on glycerol favors the formation of 1,3-PPD and reduces the production of the other solvents butanol and ethanol [22].

From these results, it is apparent that the 1,3-PPD dehydrogenase of this strain seems similar, in terms of physical properties, to the enzymes from *K. pneumoniae* and *C. freundii*. The physical properties of the 1,3-PPD dehydrogenase purified from *C. pasteurianum* have not yet been determined, although we can predict similarity between the two clostridia enzymes based on high homology of their N-terminal amino acid sequences.

## Acknowledgments

This work was supported by the Délégation Régionale à la Recherche et à la Technologie pour la Région Lorraine (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Paris, France).

We thank Dr Gérard Humbert and Franck Saunier (Université Henri Poincaré, Nancy, France) for performing the N-terminal peptide sequencing.

We thank Dr. Thomas Haas (Degussa, Hanau, Germany) for giving 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA).

## References

- [1] Homann T, Tag C, Biebl H, Deckwer WD, Schink B. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 1990;33:121–6.
- [2] Forsberg CW. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other species. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:639–43.
- [3] Abbad-Andaloussi S, Dürr C, Raval G, Petitdemange H. Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. *J Microbiol* 1996;142:1149–58.
- [4] Forage RG, Lin EEC. Dha system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. *J Bacteriol* 1982;151:591–9.
- [5] Ruch FE, Lengeler J, Lin EEC. Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 1974;119:50–6.
- [6] Abeles RH, Brownstein AM, Randles CH. B-hydroxypropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-propanediol by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim Biophys Acta* 1960;41:530–1.
- [7] Abbad-Andaloussi S, Guedon E, Spiesser E, Petitdemange H. Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *Lett Appl Microbiol* 1996;22:311–4.
- [8] Heyndrickx M, Devos P, Vacanneyt M, Deley J. The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212<sub>2</sub> and 1213<sub>1</sub> and *C. pasteurianum* LMG 3285. *Appl Microbiol Biotechnol* 1991;34:637–42.
- [9] Axelsson LT, Chung TC, Dobrogosz WJ, Lindgren SE. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbio Ecol Health Dis* 1989;2:131–6.
- [10] Johnson EA, Lin ECC. *Klebsiella pneumoniae* 1,3-propanediol NAD oxydoreductase. *J Bacteriol* 1987;169:2050–4.
- [11] Veiga-Da-Cunha M, Foster MA. 1,3-propanediol: NAD oxydoreductase of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2005–10.
- [12] Talarico TL, Axelsson LT, Novotny L, Fiuzat M, Dobrogosz WJ. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol: NAD oxydoreductase. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:943–8.
- [13] Daniel R, Boenigk R, Gottschalk G. Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpression of the corresponding gene in *E. coli*. *J Bacteriol* 1995;177:2151–6.
- [14] Daniel R, Gottschalk G. Growth temperature dependent activity of glycerol dehydratase in *E. coli* expressing the *C. freundii* dha regulon. *FEMS Microbiol Lett* 1992;100:281–6.
- [15] Luers F, Seyfried M, Daniel R, Gottschalk G. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett* 1997;154:337–45.
- [16] Petitdemange E, Dürr C, Abbad-Andaloussi S, Raval G. Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *J Ind Microbiol* 1995;15:498–502.
- [17] Biebl H, Pfenning N. Isolation of members of the family Rhodospirillaceae. In: (Starr MP, Stolp HG, Truper A, Balows A, and Schlegel HG, editors) *The procaryotes*. New York: Springer, 1982. p. 267–73.
- [18] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [19] Boenigk R. Optimierung der 1,3-propanediolbildung mit *Citrobacter freundii* und Isolierung und charakterisierung der 1,3-propanediol dehydrogenase. Doctoral Thesis, Georg-August-Universität, Göttingen. 1991.
- [20] Talarico TL, Cassas IA, Chung TC, Dobrogosz WJ. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;32:1854–8.
- [21] Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:674–9.
- [22] Dabrock B, Bahl H, Gottschalk G. Parameters effecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:1233–9.

## 2.2. La glycérol déshydrogénase

### 2.2.1. Purification de l'enzyme

La glycérol déshydrogénase chez *C. butyricum* E5 a été partiellement purifiée par les mêmes techniques et dans les mêmes conditions que la 1,3-PPD déshydrogénase. L'extrait brut est déposé sur colonne Q sépharose échangeuse d'anions, les fractions protéiques contenant l'activité glycérol déshydrogénase sont éluées avec 0,12 M KCl (**Figure 1**). Ainsi les fractions actives (17 à 20) éluées sur colonne Q sépharose sont concentrées 6-fois par ultrafiltration puis déposées sur colonne Superose 12 HR 10/30 (FPLC) dans le but de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. La glycérol déshydrogénase est éluee dans cette étape en un seul pic (**Figure 2**).

Le protocole de purification est présenté dans le **tableau 1**, la glycérol déshydrogénase de *C. butyricum* E5 est purifiée 5 fois avec un rendement de 61%.

Ce rendement est meilleur que celui de la 1,3-PPD déshydrogénase car l'enzyme est éluee dans 2 fractions (9 et 10) issues de filtration sur gel. Par contre, le taux de purification est moins élevé. Cette valeur moins élevée peut être due à des protéines contaminantes comme pourra le confirmer des expériences réalisées en électrophorèse.

### 2.2.2. Détermination de la masse moléculaire de l'enzyme

L'échantillon issu de l'ultrafiltration a été déposé sur une colonne de filtration sur gel (FPLC) afin d'estimer la masse moléculaire de l'enzyme native. Le pic d'activité des fractions actives (9 et 10) correspond d'après l'étalonnage effectué à une valeur de  $181\ 000 \pm 15\ 000$  Da.

Les fractions 7 à 13 issues de la filtration sur gel (FPLC) ont été soumises individuellement à une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS PAGE). Les fractions 9 et 10 (pistes c et d) correspondant à l'activité glycérol déshydrogénase présentent plusieurs bandes dont une majeure correspondant à une masse moléculaire de  $45\ 000 \pm 4\ 000$  Da (**Figure 3**).

Cette valeur reportée à la masse moléculaire de l'enzyme native nous conduit à faire l'hypothèse que cette enzyme serait un tétramère de 4 sous unités identiques.

La présence d'autres bandes correspondant probablement à des protéines contaminantes indique que le degré de pureté à ce stade n'est pas suffisant pour permettre d'établir une séquence N-terminale de l'enzyme.

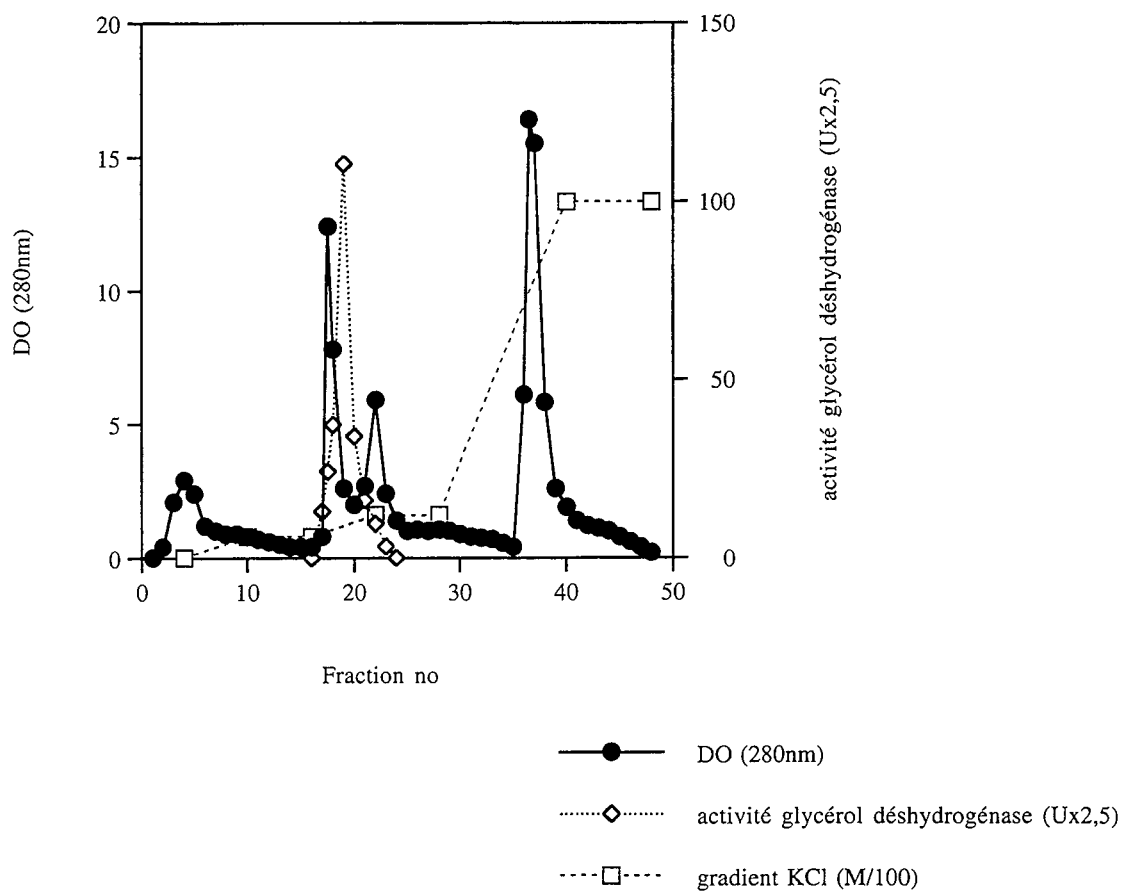
**Tableau 1** : Les étapes de purification de la glycérol déshydrogénase chez *C.butyricum* E5 <sup>a</sup>.

Étapes	Protéine (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Purification (X)	Rendement (%)
Extrait brut	115,2	533	4,6	1	100
Chromatographie par échange d'anions	46,1	372	8,1	1,8	69,8
Filtration sur gel	1,4	32,7	23,4	5,1	61,3 <sup>b</sup>

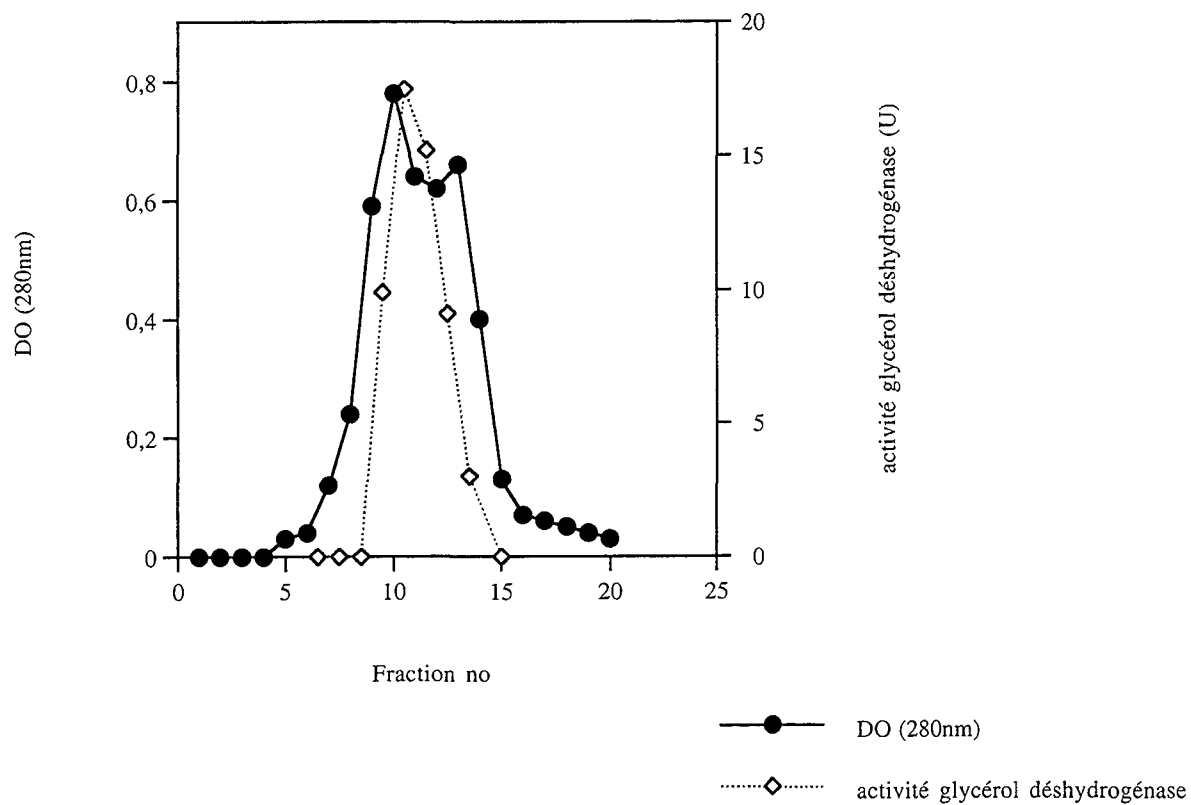
<sup>a</sup> La procédure de purification est décrite d'après (Malaoui et Marczak 2000).

<sup>b</sup> Le rendement est estimé en tenant compte du volume injecté (0,2 ml) contre le volume total obtenu après ultrafiltration (2 ml).

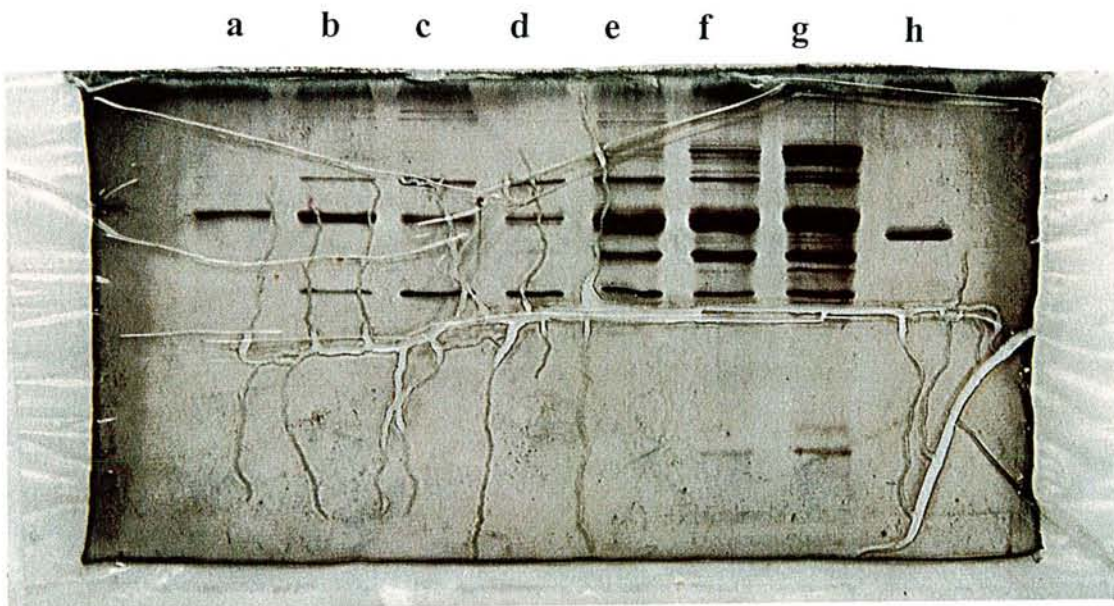




**Figure 1.** Profil d'élution de l'activité glycérol déshydrogénase chez *C. butyricum* E5 sur colonne échangeuse d'anions (Q sépharose).



**Figure 2.** Profil d'élution de l'activité glycérol déshydrogénase chez *C. butyricum* E5 par filtration sur gel (FPLC).



**Figure 3.** Electrophorèse en conditions dénaturantes de la glycérol déshydrogénase purifiée chez *C. butyricum* E5.

Les bandes protéiques sont colorées au nitrate d'argent.

Les pistes de (a-g) représentent les fractions (7-13) issues de la FPLC.

La piste (h) représente l'alcool déshydrogénase (étalon ; MM = 40 KDa).

## 2. CONCLUSION

Après extraction des cellules de *C. butyricum* E5, en conditions anaérobies, la 1,3-PPD déshydrogénase et la glycérol déshydrogénase ont été purifiées avec succès en deux étapes chromatographiques par chromatographie échangeuse d'anions suivie d'ultrafiltration puis par filtration sur gel (FPLC) avec un degré de purification respectif de 11 et 5 fois et un rendement respectif de 38% et 61%.

La technique de filtration sur gel nous a permis de déterminer la masse moléculaire de la 1,3-PPD déshydrogénase et la glycérol déshydrogénase natives qui sont respectivement de  $384\ 000 \pm 31\ 000$  Da et  $181\ 000 \pm 15\ 000$  Da.

La 1,3-PPD déshydrogénase existe sous forme d'un décamère ou d'un octamère de sous-unités de masse moléculaire identiques de  $48\ 750 \pm 4500$  Da déterminée par électrophorèse en conditions dénaturantes. Cependant la glycérol déshydrogénase est supposée être un tétramère de 4 sous unités identiques de masse moléculaire identique de  $45\ 000 \pm 4\ 000$  Da.

Nous avons déterminé la séquence N-terminale de la 1,3-PPD déshydrogénase selon la méthode automatisée d'Edman. Elle est la suivante pour les 14 premiers résidus:

**Me-Arg-Me-Tyr-Asp-Tyr-Leu-Val-Pro-Ser-Val-Asn-Phe-Me**

1                      5                      10                      14

Elle révèle 83% (10/12 résidus) d'identité avec la séquence N-terminale de la même enzyme chez *Klebsiella pneumoniae* et *Citrobacter freundii* et 78% (11/14 résidus) avec celle de *Clostridium pasteurianum*.

La séquence N-terminale de la glycérol déshydrogénase n'a pas été déterminé en raison de la présence de protéines contaminantes. Cependant, la taille moléculaire de la glycérol déshydrogénase de *C. butyricum* se rapproche de celles de *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus magaterium* et *Klebsiella aerogenes* qui sont aussi des tétramères de masse moléculaire native respectives de 180 KDa, 160 KDa et 180 KDa.

La 1,3-PPD déshydrogénase purifiée à partir de *C. butyricum* possède des caractéristiques physico-chimiques semblables à celles de *K. pneumoniae* et *C. freundii*.

L'étude de la spécificité de substrat de la 1,3-propanediol déshydrogénase de *C. butyricum* montre que cette enzyme est très spécifique au 1,3-propanediol et qu'elle est très active avec

le 3-HPA, le substrat physiologique. L'enzyme a une forte affinité pour le 3-HPA, un composé hautement toxique pour les cellules, y compris pour *C. butyricum*. Cette forte affinité pour ce composé permet à cette bactérie de transformer le 3-HPA rapidement en 1,3-PPD et ainsi empêcher son accumulation qui est létale pour la bactérie. L'activité de la 1,3-propanediol déshydrogénase de *C. butyricum* nécessite la présence d'un cation divalent et est maximale avec l'ion  $Mn^{2+}$  qui permet d'augmenter l'affinité de l'enzyme pour le 3-HPA.

De telles études concernant la glycérol déshydrogénase ne peuvent être menées que si l'on dispose d'un échantillon contenant l'activité glycérol déshydrogénase fonctionnelle et séparée de l'activité 1,3-propanediol déshydrogénase.

---

## Partie 4: SEPARATION ET CARACTERISATION DES ACTIVITES 1,3-PROPANEDIOL DESHYDROGENASE ET GLYCEROL DESHYDROGENASE CHEZ *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* E5 SAUVAGE ET MUTANT D

---

### 1. INTRODUCTION

*C. butyricum* E5 sauvage (WT) et mutant D contiennent les deux enzymes impliquées dans le catabolisme du glycérol : la 1,3-PPD déshydrogénase et la glycérol déshydrogénase codées par le régulon *dha*. Nous avons purifié jusqu'à homogénéité la 1,3-PPD déshydrogénase et partiellement la glycérol déshydrogénase chez *C. butyricum* E5 WT. Nous avons recherché ensuite à caractériser ces deux enzymes chez les deux souches, sauvage et mutante, afin de comparer leur propriétés.

Pour effectuer ce travail, il est nécessaire de séparer les deux activités enzymatiques de manière à pouvoir les caractériser individuellement sans interférence mutuelle. Les résultats précédents montrent que cette séparation est plus efficace en déposant un échantillon d'extrait brut de *C. butyricum* E5 sur une colonne de filtration sur gel (FPLC). En effet, il est possible de retenir au maximum les activités 1,3-PPD déshydrogénase et glycérol déshydrogénase et d'éviter ainsi la nécessité d'étapes ultérieures pouvant entraîner une perte supplémentaire d'activité enzymatique.

Cette comparaison pourra expliquer pourquoi ces deux souches sont considérées comme des candidats compétitifs pour la bioconversion du glycérol en 1,3-PPD.

### 2. RESULTATS

Les résultats de l'étude de la séparation et la caractérisation des activités 1,3-PPD déshydrogénase et glycérol déshydrogénase chez *C. butyricum* E5 WT et MD sont présentés dans l'article intitulé: " Separation and characterization of the 1.3-propanediol and glycerol dehydrogenases activities from *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant D".

## Separation and characterization of the 1,3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant D

H. Malaoui and R. Marczak

Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +, Université Henri Poincaré, Vandoeuvre lès Nancy cédex, France

692/12/00: received 20 December 2000, revised 9 February 2001 and accepted 19 February 2001

H. MALAOUI AND R. MARCZAK. 2001. *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant E5-MD were cultivated in chemostat culture on glycerol in order to compare the properties of two key enzymes of glycerol catabolism, i.e. propanediol and glycerol dehydrogenase. These two enzymes, which belong to the dha regulon, were separated by gel filtration. Both dehydrogenase activities displayed similar properties, such as pH optimum values, specificity towards physiological substrates and dependence on  $Mn^{2+}$ . Both strains accumulate glycerol at high levels, but the mutant D strain contained a propanediol dehydrogenase activity which had a low affinity for its physiological substrate, leading to the conclusion that this strain is more resistant to the toxic effect of 3-hydroxypropionaldehyde than the wild-type. These properties make *Cl. butyricum* mutant D strain the best candidate so far to be used as a biotechnological agent for the bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol.

### INTRODUCTION

*Clostridium butyricum*, a strictly anaerobic spore-forming bacterium, usually metabolizes glycerol to 1,3-propanediol (1,3-PPD), acetate, butyrate, carbon dioxide ( $CO_2$ ) and molecular hydrogen ( $H_2$ ). Part of the reduced ferredoxin is reoxidized by the ferredoxin-NAD<sup>+</sup> reductase, which explains why glycerol fermentation yields considerably less  $H_2$  than  $CO_2$  (Biebl *et al.* 1992). The enzymes glycerol dehydrogenase, diol dehydratase and 1,3-PPD dehydrogenase constitute the branch point that partitions the carbon flux between the competing pathways, i.e. formation of either 1,3-PPD or pyruvate. The increasing levels of these enzyme activities with increasing dilution rates explain the constant proportion of glycerol conversion into 1,3-PPD (Abbad-Andaloussi *et al.* 1996a). The same constancy in the conversion of glycerol into 1,3-PPD is also observed with hydrogenase-negative mutants obtained from *Cl. butyricum* DSM 5431 (Abbad-Andaloussi *et al.* 1995) and allyl alcohol-resistant mutants obtained from *Cl. butyricum* E5 (Abbad-Andaloussi *et al.* 1996b). Allyl alcohol resistance cannot be attributed to the loss of 1,3-PPD dehydrogenase. The

apparent  $K_m$  values of the various reactions catalysed by 1,3-PPD dehydrogenase in crude extracts of wild-type and mutant E5-MD do not differ greatly for NAD<sup>+</sup> and NADH but show clearly in mutant D a decreasing  $K_m$  value for glyceraldehyde, a non-physiological substrate, and an increasing  $K_m$  value for 1,3-PPD and allyl alcohol (Abbad-Andaloussi *et al.* 1996b).

1,3-propanediol dehydrogenase (1,3-PPD dehydrogenase; EC 1.1.1.202) was detected originally in extracts of glycerol-grown cells as an enzyme that catalyses the oxidation of NADH at the expense of 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) (Abeles *et al.* 1960). In contrast to the 1,3-PPD-forming enteric bacteria, little is known about the enzyme responsible for glycerol breakdown by clostridia. The activities of glycerol dehydrogenase, glycerol dehydratase and 1,3-PPD dehydrogenase have been determined in crude extracts of *Cl. butyricum* (Abbad-Andaloussi *et al.* 1996a) and the latter activity in *Cl. pasteurianum* (Heyndrickx *et al.* 1991). It is most likely that glycerol catabolism by *Cl. butyricum* requires 1,3-PPD dehydrogenase activity to avoid intracellular accumulation of 3-HPA, a very toxic compound (Axelsson *et al.* 1989). 1,3-PPD dehydrogenase has been purified from *Klebsiella pneumoniae* (Johnson and Lin 1987), *Lactobacillus buchneri* and *Lact. brevis* (Veiga-Cunha and Foster 1992), *Lact. reuteri* (Talarico *et al.* 1990) and *Citrobacter freundii* (Daniel *et al.* 1995a). The entire dhaT

Correspondence to: R. Marczak, Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +, Domaine scientifique Victor Grignard, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre lès Nancy cédex, France (e-mail: marczak@lcb.u-nancy.fr).

regulon of *C. freundii* has been cloned and expressed in *Escherichia coli* (Daniel and Gottschalk 1992). The gene encoding glycerol dehydratase and 1,3-PPD dehydrogenase of *Cl. pasteurianum* has been cloned and expressed in *E. coli* and the sequence of the *dha* gene has been determined (Luers *et al.* 1997). Recently, 1,3-PPD dehydrogenase from *Cl. butyricum* E5 wild-type has been purified. Similarity was found between the N-terminal amino acid sequence of the 1,3-PPD dehydrogenase of *Cl. butyricum* and that of *K. pneumoniae*, *C. freundii* and *Cl. pasteurianum* (Malaoui and Marczak 2000).

Glycerol dehydrogenase (glycerol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase, EC 1.1.1.6) has been purified from *K. aerogenes* (Ruch *et al.* 1980), *C. freundii* (Daniel *et al.* 1995b), *Bacillus megaterium* (Scharschmidt *et al.* 1983), *B. stearothermophilus* (Spencer *et al.* 1989) *Schizosaccharomyces pombe* (Marshall *et al.* 1985) and *E. coli* (Tang *et al.* 1979).

The purpose of this study is the characterization of the 1,3-PPD and glycerol dehydrogenase of *Cl. butyricum* wild-type E5 and mutant E5-MD cultivated in chemostat culture on glycerol. These two enzymes are separated by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) before characterization, which allows the properties of each enzyme to be studied without any cross-interference. The comparison of these properties should explain why these strains can be considered as competitive candidates for the bioconversion of glycerol to 1,3-PPD.

## MATERIALS AND METHODS

### Organism and medium

*Clostridium butyricum* E5 and E5-MD, resistant to allyl alcohol, were used. The spores of the strains were stored at 4°C in Hungate tubes in Reinforced Clostridial Medium (RCM; Oxoid). For inoculum preparation, spores were transferred to RCM medium, heat-shocked at 80°C for 10 min, and incubated at 34°C under anaerobic conditions in Hungate tubes. The pre-culture medium contained the following components (l<sup>-1</sup> dionized water): glycerol 20 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.0 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 15 mg; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 mg; CaCO<sub>3</sub>, 2.0 g; yeast extract, 1.0 g; trace element solution SL7 (Biebl and Pfenning 1982) 2 ml.

The growth temperature was 34°C. This medium, without CaCO<sub>3</sub>, and with 60 g l<sup>-1</sup> glycerol, was used as the culture medium in the bioreactor.

### Fermentation modes

*Clostridium butyricum* E5 and E5-MD were grown in glycerol-limited continuous culture. The continuous culture was carried out aseptically in 2 litre bioreactor (LSL-

Biolafite, 2 litre growth vessel with a 1 litre working volume). The temperature was controlled at 34°C and the pH at 6.8 with 2 mmol l<sup>-1</sup> KOH. Anaerobic conditions were maintained by sparging with nitrogen. Agitation was kept constant at 100 rev min<sup>-1</sup>. The culture volume was kept constant at 1 litre by automatic regulation of the culture level. The bioreactor was inoculated (10%, v/v) with exponential pre-culture. The culture was grown in batch for 6–12 h, and then the continuous culture was started with a glycerol input concentration of 10 g l<sup>-1</sup>.

### Preparation of cell-free extracts

Cells grown on glycerol were resuspended in Tris buffer (50 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl; 2.0 mmol l<sup>-1</sup> DL-dithiothreitol; 1 mmol l<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>; pH 7.4), sparged with nitrogen and centrifuged at 12 000 g for 15 min. The cells were sonicated at 2°C for 20 s at a frequency of 20 kHz, followed by a 60 s pause (150 W ultrasonic disintegrator; MSE, UK); this cycle was repeated four times. The supernatant fluid was collected from the cell lysate by centrifugation at 12 000 g for 20 min at 4°C. At each step, extracts were maintained under a nitrogen atmosphere. The protein concentration of cell extracts was determined according to the method of Lowry *et al.* (1951), using crystalline bovine serum albumin as the standard. One unit of enzyme activity was the amount catalysing the formation of one micromole of product per minute under the specified conditions.

### Gel filtration

Part of the supernatant fraction of the cell extract from *Cl. butyricum* E5 was applied, through a 0.2 ml injection loop, to a high resolution (HR 10/30) superose 12 column of the Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) Pharmacia system. The column was equilibrated with 50 mmol l<sup>-1</sup> potassium phosphate buffer (KPB, pH 7.4) containing 100 mmol l<sup>-1</sup> KCl and 2 mmol l<sup>-1</sup> DTT (flow rate, 0.5 ml min<sup>-1</sup>). The active fractions (1 ml volumes) were eluted with the same buffer and used for characterization of 1,3-PPD dehydrogenase and glycerol dehydrogenase activities.

### Enzyme assays

The activities of 1,3-PPD dehydrogenase (EC 1.1.1.202) and glycerol dehydrogenase (EC 1.1.1.6) were assayed at 37°C in a SHIMADZU UV-160 A spectrophotometer equipped with a Haake D1 circulating water bath to control the sample cell temperature. Activities were measured by the linear increase in absorbance at 340 nm (A<sub>340</sub>) produced by addition of the enzyme fraction. The assay mixture contained 100 mmol l<sup>-1</sup> 1,3-PPD or glycerol, 2 mmol l<sup>-1</sup>



$\text{NAD}^+$ , 30  $\text{mmol l}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 100  $\text{mmol l}^{-1}$  potassium carbonate buffer (pH 9.7) in a 1 ml final volume.

### Determination of the optimum pH

Assays to determine the optimum pH were performed with 0.2  $\text{mol l}^{-1}$  KPB adjusted to the appropriate pH values with 3  $\text{mol l}^{-1}$  KOH or 3  $\text{mol l}^{-1}$  HCl. DL-glyceraldehyde (DL-Gld) 10  $\text{mmol l}^{-1}$ , dihydroxyacetone (DHA) 10  $\text{mmol l}^{-1}$  and 3-HPA 3.5  $\text{mmol l}^{-1}$  were reduced in the presence of 0.37  $\text{mmol l}^{-1}$  NADH. 1,3-PPD 100  $\text{mmol l}^{-1}$  and glycerol 100  $\text{mmol l}^{-1}$  were oxidized in the presence of 2  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{NAD}^+$ . The optimum pH values were calculated by non-linear regression to the Bell-Shaped Double pKa equation by use of the Curve Fit feature of the Graft programme (Erithacus Software, London, UK).

### Determination of kinetic parameters

The apparent  $K_m$  values obtained with substrates and coenzymes were determined at 37°C with  $\text{K}_2\text{CO}_3$  buffer (pH 9.7 for the oxidative reactions and pH 9.1 for the reductive reactions). They were determined from the results of experiments in which a fixed concentration of the other reactant was used.

The apparent  $K_m$  values were expressed in  $\text{mmol l}^{-1}$  and calculated by non-linear regression to the Michaelis Menten equation by use of the Curve Fit feature of the Graft programme.

### Determination of substrate specificity

The activities of 1,3-PPD dehydrogenase and glycerol dehydrogenase in oxidation reactions were determined

spectrophotometrically at 340 nm by use of the initial rate substrate-dependent NADH increase at 37°C. The assay mixture contained 100  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{K}_2\text{CO}_3$  buffer (pH 9.7), 30  $\text{mmol l}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{NAD}^+$  and 100  $\text{mmol l}^{-1}$  substrate in a 1 ml final volume. The activities were expressed relative to those obtained with 1,3-PPD or glycerol, respectively.

The enzyme activities in reduction reactions were determined under the same conditions as those described for oxidation reactions, except that the assay mixture contained 100  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{K}_2\text{CO}_3$  buffer (pH 9.1), 30  $\text{mmol l}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.37  $\text{mmol l}^{-1}$  NADH and 100  $\text{mmol l}^{-1}$  substrate in 1 ml final volume. Activities were expressed relative to those obtained with 3-HPA.

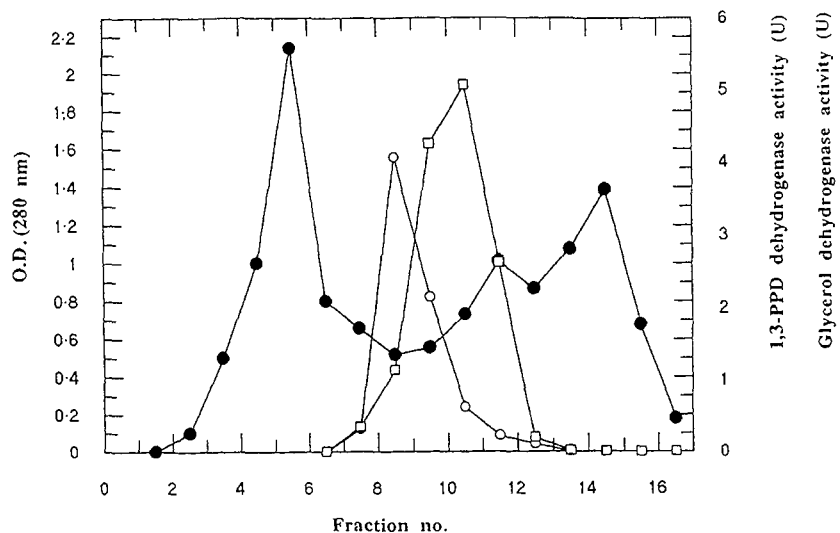
### Effect of enzyme by mono and divalent cations

The chloride salts of ammonium, sodium, potassium, magnesium or lithium (10  $\text{mmol l}^{-1}$ ), and iron, manganese or calcium (1  $\text{mmol l}^{-1}$ ), were included with 100  $\text{mmol l}^{-1}$  1,3-PPD or glycerol, 2  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{NAD}^+$  and 100  $\text{mmol l}^{-1}$  carbonate buffer (pH 9.0) to determine the effect of these cations on the 1,3-PPD dehydrogenase and glycerol dehydrogenase activities.

## RESULTS

### Separation of 1,3-PPD dehydrogenase and glycerol dehydrogenase from *Cl. butyricum* by gel filtration

1,3-PPD dehydrogenase and glycerol dehydrogenase from *Cl. butyricum* E5 wild-type were separated by gel filtration as two enzymatic peaks (Fig. 1). The 1,3-PPD dehydrogenase



**Fig. 1** Elution profile of 1,3-PPD dehydrogenase and glycerol dehydrogenase activities of *Clostridium butyricum* E5 from Superose 12 HR 10/30 column. The column was developed in 50  $\text{mmol l}^{-1}$  KPB buffer. The optical density (O.D.) at 280 nm (●) was determined for each fraction. 1,3-PPD dehydrogenase activity (O) and glycerol dehydrogenase activity (□) were expressed as described in Materials and Methods

was eluted as a single peak with an elution time of 17 min (fraction 8) and the glycerol dehydrogenase as a single peak with an elution time of 21 min (fraction 10).

According to the method used to determine the molecular mass of the native 1,3-PPD dehydrogenase (Malaoui and Marczak 2000), the molecular mass of the native glycerol dehydrogenase can be estimated to be  $181\ 000 \pm 15\ 000$  Da.

A summary of the separation protocol of 1,3-PPD and glycerol dehydrogenase by gel filtration is presented in Table 1 and Table 2, respectively. 1,3-PPD dehydrogenase was purified fivefold with a 53% recovery, and glycerol dehydrogenase was also purified fivefold with a 35% recovery. Residual activities in fraction 10 for 1,3-PPD dehydrogenase and in fraction 8 for glycerol dehydrogenase were compared with those found in crude extract and can be attributed to non-specific substrate oxidation by the other enzyme.

Similar results were obtained with *Cl. butyricum* E5-MD (data not shown).

#### Determination of the optimum pH of 1,3-PPD dehydrogenase from *Cl. butyricum* E5 wild-type and mutant D

The optimum pH values for the oxidation reaction of 1,3-PPD and for the reduction reaction of DL-Gld and 3-HPA catalysed by 1,3-PPD dehydrogenase are summarized in Table 3.

**Table 1** Recovery of 1,3-propanediol dehydrogenase after gel filtration from *Clostridium butyricum* E5 wild-type

Steps	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg <sup>-1</sup> )	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude extract	8.91	7.67	0.86	1.0	100
Gel filtration:					
Fraction 8	0.90	4.06	4.51	5.2	52.9
Fraction 10	0.62	0.63	1.01	1.2	8.2

U: enzymatic unit defined as described in Materials and Methods.

**Table 2** Recovery of glycerol dehydrogenase after gel filtration from *Clostridium butyricum* E5 wild-type

Steps	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg <sup>-1</sup> )	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude extract	8.91	14.34	1.61	1.0	100
Gel filtration:					
Fraction 8	0.90	1.14	1.26	0.8	7.9
Fraction 10	0.62	5.06	8.16	5.1	35.3

U: Enzymatic unit defined as described in Materials and Methods.

**Table 3** Determination of the optimum pH of 1,3-propanediol dehydrogenase isolated from gel filtration for oxidation and reduction reactions

Reactions and substrates	Optimum pH*	
	Fraction 8 WT†	Fraction 8 MD
Reduction by NADH		
3-Hydroxypropionaldehyde	9.07 (0.37)	9.20 (0.15)
DL-Glyceraldehyde	7.07 (0.20)	7.43 (0.15)
Oxidation by NAD <sup>+</sup>		
1,3-Propanediol	9.72 (0.19)	8.24 (0.58)

\*Optimum pH values were determined as described in Materials and Methods. Standard deviations (of three determinations) are given in parentheses.

†Data obtained from Malaoui and Marczak 2000.

WT: wild-type, MD: mutant D.

The enzyme of both strains exhibited Bell-Shaped-Double pKa kinetics. In the direction of reduction of the 3-HPA and DL-Gld, Table 3 shows that the optimum pH was nearly the same whatever the strain under study. By contrast, the optimum pH differed by two units according to the substrate used. In the direction of oxidation of 1,3-PPD, the optimum pH of the enzyme differed by one unit between the mutant D and the wild-type.

#### Determination of the optimum pH of glycerol dehydrogenase from *Cl. butyricum* E5 wild-type and mutant D

The optimum pH values for the oxidation reaction of glycerol and for the reduction reaction of DHA catalysed by glycerol dehydrogenase are summarized in Table 4.

The glycerol dehydrogenase of both strains exhibited Bell-Shaped-Double pKa kinetics. Table 4 shows that there was no significant difference in the optimum pH value for glycerol dehydrogenase in the direction of DHA reduction,

**Table 4** Determination of the optimum pH of glycerol dehydrogenase isolated from gel filtration for oxidation and reduction reactions

Reactions and substrates	Optimum pH*	
	Fraction 10 WT	Fraction 10 MD
Reduction by NADH		
Dihydroxyacetone	8.60 (0.17)	8.31 (0.04)
Oxidation by NAD <sup>+</sup>		
Glycerol	7.17 (0.46)	7.49 (0.53)

\*Optimum pH values were determined as described in Materials and Methods. Standard deviations (of three determinations) are given in parentheses.

WT: wild-type, MD: mutant D.

and in that of glycerol oxidation, between the two strains. On the other hand, the optimum pH value of the reaction of glycerol oxidation was one unit lower than that of the reaction of DHA reduction.

#### Determination of kinetic parameters of 1,3-PPD dehydrogenase from *Cl. butyricum* E5 wild-type and mutant D

The apparent  $K_m$  values determined for various reactions catalysed by 1,3-PPD dehydrogenase are summarized in Table 5. The 1,3-PPD dehydrogenase of both strains exhibited Michaelis-Menten kinetics. Table 5 shows that the apparent  $K_m$  of 1,3-PPD dehydrogenase of mutant D for the various substrates and coenzymes tested was two to five times higher than that of the enzyme of the wild-type. This implies that the enzyme of mutant D had less affinity than the enzyme of the wild-type for the respective substrates. Among the substrates studied, it appeared that the physiological substrate (3-HPA) had more affinity for the enzyme than the non-physiological substrate DL-Gld, nine times more in mutant D and seven times more in the wild-type.

**Table 5** Determination of  $K_m$  values for substrates and coenzymes of 1,3-propanediol dehydrogenase isolated from gel filtration

Substrate or coenzyme tested	Other reactant	$K_m$ (mmol l <sup>-1</sup> )*	
		Fraction 8 WT†	Fraction 8 MD
1,3-PPD	2 mmol l <sup>-1</sup> NAD <sup>+</sup>	3.55 (0.72)	11.0 (1.59)
NAD <sup>+</sup>	100 mmol l <sup>-1</sup> 1,3-PPD	0.20 (0.04)	0.28 (0.03)
NADH	3.5 mmol l <sup>-1</sup> 3-HPA	0.06 (0.01)	0.35 (0.09)
NADH	10 mmol l <sup>-1</sup> DL-Gld	0.08 (0.03)	0.32 (0.13)
3-HPA	0.37 mmol l <sup>-1</sup> NADH	0.17 (0.02)	0.26 (0.07)
DL-Gld	0.37 mmol l <sup>-1</sup> NADH	1.18 (0.36)	2.27 (0.30)

\* $K_m$  values were calculated by non linear regression to the Michaelis-Menten equation using the Curve Fit feature of the Grafit programme (Erithacus Software). Standard deviations (of three determinations) are given in parentheses.

†Data obtained from Malaoui and Marczak 2000.

WT: wild type, MD: mutant D, 1,3-PPD: 1,3-propanediol, 3-HPA: 3-hydroxypropionaldehyde, DL-Gld: DL-glyceraldehyde.

**Table 6** Determination of  $K_m$  values for substrates and coenzymes of glycerol dehydrogenase isolated from gel filtration

Substrate or coenzyme tested	Other reactant	$K_m$ (mmol l <sup>-1</sup> )*	
		Fraction 10 WT	Fraction 10 MD
Glycerol	2 mmol l <sup>-1</sup> NAD <sup>+</sup>	91.7 (19.2)	76.3 (11.7)
NAD <sup>+</sup>	100 mmol l <sup>-1</sup> glycerol	4.07 (0.97)	4.70 (1.08)
DHA	0.37 mmol l <sup>-1</sup> NADH	1.18 (0.13)	2.00 (0.14)
NADH	10 mmol l <sup>-1</sup> DHA	0.08 (0.01)	0.12 (0.03)

\* $K_m$  values were calculated by non linear regression to the Michaelis-Menten equation using the Curve Fit feature of the Grafit programme (Erithacus Software). Standard deviations (of three determinations) are given in parentheses.

WT: wild-type, MD: mutant D, DHA: dihydroxyacetone.

#### Determination of kinetic parameters of glycerol dehydrogenase from *Cl. butyricum* E5 wild-type and mutant D

The apparent  $K_m$  values determined for various reactions catalysed by glycerol dehydrogenase are summarized in Table 6. The glycerol dehydrogenase of both strains exhibited Michaelis-Menten kinetics. Table 6 shows that contrary to 1,3-PPD dehydrogenase, the affinity of glycerol dehydrogenase of both mutant D and wild-type, with respect to the substrates and coenzymes tested, was relatively close. In both strains, the enzyme had much less affinity for its substrate in the direction of use of glycerol than in the opposite direction. This implies that the use of large amounts of glycerol was made possible in both strains.

#### Determination of substrate specificity of 1,3-PPD dehydrogenase from *Cl. butyricum* E5 wild-type and mutant D

Substrate specificity studies showed that 1,3-PPD dehydrogenase was capable of catalysing a number of oxidation and reduction reactions (Table 7).

**Table 7** Substrate specificity of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Clostridium butyricum* E5 wild type and mutant D

Reactions and substrates	Relative activity (%)*	
	Fraction 8 WT†	Fraction 8 MD
Reduction by NADH		
3-Hydroxypropionaldehyde	100	100
Acetaldehyde	6.2	5.5
Dihydroxyacetone	5.9	32.3
DL-Glyceraldehyde	2.9	8.9
Propionaldehyde	2.6	40.1
N-Butyraldehyde	0	4.9
Oxidation by NAD <sup>+</sup>		
1,3-Propanediol	100	100
1-Butanol	8.1	6.8
1,2-Propanediol	< 1	1.9
Glycerol	28.0	11.4
2,3-Butanediol	< 1	0
Ethylene glycol	0	0
2-Propanol	0	< 1
Glycerol-3-P	0	0

\*Relative activities for oxidation and reduction of substrates were determined as described in Materials and Methods.

†Data obtained from Malaoui and Marczak 2000.

WT: wild-type, MD: mutant D.

Table 7 shows that in the physiological direction, the enzyme of both strains was most active with the physiological substrate (3-HPA). The enzyme of mutant D presented less specificity for other aldehydes tested because the relative activities were higher. Thus, reduction of propionaldehyde accounted for 40% of that of 3-HPA in mutant D and only 2.6% in the wild-type. In the non-physiological direction, it appeared that 1,3-PPD was the preferred substrate for the two strains. Glycerol was the second most active substrate in both wild-type and mutant D, with a relative activity of 28% and 11%, respectively. Other alcohols tested had little or no activity.

#### Determination of substrate specificity of glycerol dehydrogenase from *Cl. butyricum* E5 wild-type and mutant D

Substrate specificity studies showed that glycerol dehydrogenase was also able of catalysing a number of oxidation and reduction reactions (Table 8).

Table 8 shows that in the non-physiological direction, glycerol dehydrogenase of both strains was most active with 3-HPA. The specificity of the enzyme for the other substrates studied was, in most cases, less extended for the two strains than that of the 1,3-PPD dehydrogenase. As for the latter enzyme, the glycerol dehydrogenase of mutant D was relatively more active than in the wild-type with respect

**Table 8** Substrate specificity of glycerol dehydrogenase from *Clostridium butyricum* E5 wild type and mutant D

Reactions and substrates	Relative activity (%)*	
	Fraction 10 WT	Fraction 10 MD
Reduction by NADH		
3-Hydroxypropionaldehyde	100	100
Acetaldehyde	7.5	26.9
Dihydroxyacetone	7.0	76.5
DL-Glyceraldehyde	8.1	45.8
Propionaldehyde	7.7	31.4
N-Butyraldehyde	7.0	21.0
Oxidation by NAD <sup>+</sup>		
Glycerol	100	100
1-Butanol	1.8	3.8
1,2-Propanediol	< 1	14.3
1,3-Propanediol	12.4	6.9
2,3-Butanediol	2.0	4.4
Ethylene glycol	< 1	2.3
2-Propanol	< 1	3.1

\*Relative activities for oxidation and reduction of substrates were determined as described in Materials and Methods.

WT: wild-type, MD: mutant D.

to the substrate. In the physiological direction, glycerol was the preferred substrate for both strains. Other alcohols tested were oxidized with a much lower relative activity, displaying a maximum of 14% of that obtained with glycerol.

#### Effect of mono and divalent cations on 1,3-PPD dehydrogenase from *Cl. butyricum* E5 wild-type and mutant D

Table 9 shows that Mn<sup>2+</sup> was the cation which most stimulated 1,3-PPD dehydrogenase activity in both strains. In mutant D, some other cations tested, in particular NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup> and Li<sup>+</sup>, also stimulated enzymatic activity (in that order of decreasing relative activity). In the wild-type, the most effective cations after Mn<sup>2+</sup> were Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> (in that order of decreasing relative activity).

#### Effect of mono and divalent cations on glycerol dehydrogenase from *Cl. butyricum* E5 wild-type and mutant D

Table 10 shows that Mn<sup>2+</sup> was the most active cation on glycerol dehydrogenase activity in both strains, as for 1,3-PPD dehydrogenase. In the case of mutant D, no other cation allowed significant stimulation of activity compared with that of Mn<sup>2+</sup>. On the other hand, in the case of the wild-type, only Ca<sup>2+</sup> allowed a significant stimulation of enzymatic activity.

**Table 9** Determination of the effect of mono and divalent cations on 1,3-propanediol dehydrogenase activity

Cations	Concentration (mmol l <sup>-1</sup> )	Relative activity (%)*	
		Fraction 8 WT†	Fraction 8 MD
None		14.2	23.4
Mn <sup>2+</sup>	1	100	100
Mg <sup>2+</sup>	10	37.9	18.9
Na <sup>+</sup>	10	32.9	13.9
Li <sup>+</sup>	10	31.6	36.7
K <sup>+</sup>	10	28.7	18.6
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	10	19.4	67.4
Ca <sup>2+</sup>	1	12.5	13.9
Fe <sup>2+</sup>	1	11.3	39.9

\*Relative activities were determined as described in Materials and Methods.

†Data obtained from Malaoui and Marczak 2000.

WT: wild-type, MD: mutant D.

**Table 10** Determination of the effect of mono and divalent cations on glycerol dehydrogenase activity

Cations	Concentration (mmol l <sup>-1</sup> )	Relative activity (%)*	
		Fraction 10 WT	Fraction 10 MD
None		11.2	9.0
Mn <sup>2+</sup>	1	100	100
Mg <sup>2+</sup>	10	10.5	21.2
Na <sup>+</sup>	10	17.7	16.5
Li <sup>+</sup>	10	26.9	21.8
K <sup>+</sup>	10	28.9	20.5
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	10	35.6	5.6
Ca <sup>2+</sup>	1	64.5	22.0
Fe <sup>2+</sup>	1	26.3	8.7

\*Relative activities were determined as described in Materials and Methods.

WT: wild-type, MD: mutant D.

## DISCUSSION

*Clostridium butyricum* E5 wild-type and MD, a mutant resistant to allyl alcohol, have been shown to contain two key enzymes which take part in the catabolism of glycerol in the dha regulon (Forage and Foster 1982). The first enzyme, 1,3-PPD dehydrogenase, was purified and characterized in *Cl. butyricum* E5 wild-type (Malaoui and Marczak 2000).

The determination of the molar mass, the number of the subunits and the N-terminal sequence allows its properties to be compared with those reported in *Kl. pneumoniae*, *C. freundii* and *Cl. pasteurianum*. The separation of the two enzymes by gel filtration also allowed estimation of the molar mass of glycerol dehydrogenase of *Cl. butyricum* E5 wild-type.

The value of 181 000 ± 15 000 Da (supposed tetramer) approached that reported in *C. freundii* (hexamer of M<sub>r</sub> = 246 000 Da) more closely than those reported in *S. pombe* (octamer of M<sub>r</sub> = 400 000 Da) or *E. coli* K12-mutant (octamer of M<sub>r</sub> = 310 000 Da and dimer of M<sub>r</sub> = 81 000 Da).

The same technique enabled characterization of each enzyme by its specific properties. In both strains, the optimum pH of the two enzymes for the substrates studied did not differ to a significant degree and remained largely superior or equal to 7. In the case of 1,3-PPD dehydrogenase, a difference of one unit appeared according to the method employed. These values are close to that used or determined in *Kl. pneumoniae* (Johnson and Lin 1987).

On the contrary, the optimum pH of 1,3-PPD dehydrogenase for the reduction of the 3-HPA is lower in *E. agglomerans* (Barbirato *et al.* 1997), and even more so in *Lact. reuteri* (Talarico *et al.* 1990), with respective values of 7.8 and 6.2. The optimum pH of the glycerol dehydrogenase in the direction of DHA reduction is lower in *E. coli* K12 mutant (Tang *et al.* 1979) and *S. pombe* (Marshall *et al.* 1985) with a value of 6, while in the direction of glycerol oxidation it is higher with a value of around 10, contrary to the values observed in *Cl. butyricum* strains.

1,3-PPD dehydrogenase of the mutant exhibited an increase in apparent K<sub>m</sub> values for the respective substrates, in contrast to glycerol dehydrogenase. These results indicate that the mutation acted mostly on the 1,3-PPD formation pathway.

1,3-PPD dehydrogenase had a high affinity for its physiological substrate in the two strains. Thus, 3-HPA, which is an intermediary product, is quickly oxidized to 1,3-PPD, preventing its accumulation as a toxic product. The apparent K<sub>m</sub> of 3-HPA in the wild strain was close to that of *C. freundii*, which is 0.14 mmol l<sup>-1</sup> (Daniel *et al.* 1995a). In mutant D it approached that of *E. agglomerans* (Barbirato *et al.* 1997), which is four times higher. Since mutant D had a lower affinity for 3-HPA, this strain would seem more resistant to the toxic effect of 3-HPA. The 1,3-PPD dehydrogenase of *Lact. reuteri* has one apparent K<sub>m</sub> distinctly higher (7.8 mmol l<sup>-1</sup>) than that of the two studied strains. This high K<sub>m</sub> value allows the bacterium to accumulate 3-HPA.

The glycerol dehydrogenase of both strains exhibited a low affinity for glycerol, which is the substrate of the metabolic pathway allowing the formation of the products. This low affinity allowed the bacterium to accumulate glycerol and to use it with a higher conversion rate to 1,3-PPD than in other strains, such as *C. freundii*, *S. pombe* and *E. coli* K12-mutant, for which the K<sub>m</sub> for glycerol is lower. On the other hand, the enzyme had an apparent K<sub>m</sub> value for DHA lower than that for glycerol. The reaction can therefore easily occur in the opposite direction. Consequently, both strains can

accumulate glycerol and use it in different metabolic pathways, such as 1,3-PPD formation.

In both strains, there was a correlation between the affinity of 1,3-PPD dehydrogenase for 3-HPA and its specificity with respect to the substrates, as this enzyme is most effective with its physiological substrate. The enzyme of the wild strain retained 2–6% of the activity with other aldehydes tested. However, the enzyme of the mutant D is less specific as it retained 4–40% of the activity with other aldehydes. The low specificity of the enzyme of mutant D is due to the fact that it had a lower affinity for 3-HPA, which allowed the other substrates to replace it with a larger relative effectiveness. Like *Cl. butyricum*, 1,3-PPD dehydrogenase of *C. freundii* is also most active with 3-HPA and considerably less active with other aldehydes (Daniel *et al.* 1995a). On the contrary, the 1,3-PPD dehydrogenase of *Lact. reuteri* reduces at a similar rate the aldehydes 3-HPA, DHA and hydroxyacetone (Talarico *et al.* 1990).

In the non-physiological direction, the 1,3-PPD dehydrogenase of both strains was relatively specific for 1,3-PPD because, among other primary alcohols tested, only 1-butanol and glycerol were acted on significantly. The same specificity was found in the enzyme of *Kl. pneumoniae* (Johnson and Lin 1987). However, *C. freundii*, *Lact. brevis* and *Lact. buchneri* enzymes also oxidize *n*-propanol, *n*-butanol and 1,4-butanediol to their corresponding aldehydes, in addition to 1,3-PPD which remains the most active substrate. On the contrary, the 1,3-PPD dehydrogenase of *Lact. reuteri* is more active with the substrates which have adjacent hydroxyl functions, such as glycerol and 1,2-PPD. 1,3-PPD is oxidized at approximately 5% of the maximal rate observed for glycerol and 1,2-PPD (Talarico *et al.* 1990).

In both strains, glycerol dehydrogenase was most active in the physiological direction with its natural substrate, glycerol. The same observation was made for the enzyme of *C. freundii* (Daniel *et al.* 1995b), whereas the enzymes of *E. coli* K12 mutant and *S. pombe* oxidized 1,2-PPD more quickly than glycerol. In the non-physiological direction, the glycerol dehydrogenase of both *Cl. butyricum* strains was more active with 3-HPA. However, the enzyme of mutant D also reduces DHA with significant activity. The glycerol dehydrogenase of mutant D appeared less specific with respect to the substrates than that of the wild strain. On the contrary, the enzyme of other strains, such as *S. pombe*, *C. freundii* and *E. coli* K12 mutant, is more active with DHA. However, the enzyme of *E. coli* K12 mutant reduces acetol with the same activity as that for DHA. The reducing pathway seemed more sensitive to mutation than the oxidative pathway because the two enzymes glycerol dehydrogenase and 1,3-PPD dehydrogenase of mutant D were less specific than those of the wild strain.

The specificity of the enzymes studied was also observed with respect to the added cations. In the absence of cations,

1,3-PPD dehydrogenase and glycerol dehydrogenase of the two strains can function, in contrast with 1,3-PPD dehydrogenase of *Lact. buchneri* and *Lact. brevis* whose activity is not detected (Veiga-Da-Cunha and Foster 1992). Like the 1,3-PPD dehydrogenase of *C. freundii*, both enzymes of the two studied strains are preferentially activated with  $Mn^{2+}$ , whereas for the 1,3-PPD dehydrogenase of *Kl. pneumoniae*, *Lact. brevis* and *Lact. buchneri*,  $Mn^{2+}$  can be replaced by  $Fe^{2+}$ . On the other hand, the 1,3-PPD dehydrogenase from *C. freundii*, as well as over-produced enzyme of the recombinant *E. coli*, are preferentially activated by  $Fe^{2+}$ . Like glycerol dehydrogenase of *S. pombe*, 1,3-PPD dehydrogenase of *Lact. reuteri* requires for its optimal activity only one monovalent cation, i.e.  $K^+$ . Contrary to the 1,3-PPD dehydrogenase of the other strains, the enzyme of *E. agglomerans* does not show obvious dependence for a cation, except that its activity is better preserved in the presence of  $Mn^{2+}$ . Finally,  $NH_4^+$  is the most effective activator for glycerol dehydrogenase of *E. coli* K12 mutant.

The two studied strains contain two enzymes, 1,3-PPD dehydrogenase and glycerol dehydrogenase, which share jointly several properties, such as pH optimum, specificity with respect to physiological substrates and dependence on  $Mn^{2+}$ . These results suggest that the two proteins belong to the same dha regulon. The properties show that both strains are good candidates as biotechnological agents for the bioconversion of glycerol which they can accumulate. The mutant D strain has the advantage compared with the wild strain of being less sensitive to the toxic effect of 3-HPA, an intermediary product of this metabolic pathway. Therefore, it becomes the best candidate for use in a process of metabolic engineering leading to the production of 1,3-PPD starting from various carbon sources, such as glycerol.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Délégation Régionale à la Recherche et à la Technologie pour la région Lorraine (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Paris, France). The authors thank Dr Thomas Haas (Degussa, Hanau, Germany) for giving 3-hydroxypropion-aldehyde (3-HPA).

## REFERENCES

- Abbad-Andaloussi, S., Amine, J., Gerard, P. and Petitdemange, E. (1996a) Properties of allyl alcohol mutants of *Clostridium butyricum* grown on glycerol. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3499–3501.
- Abbad-Andaloussi, S., Durr, C., Raval, G. and Petitdemange, H. (1996b) Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. *Microbiology* **142**, 1149–1158.

- Abbad-Andaloussi, S., Manginot-Durr, C., Amine, J., Petitdemange, E. and Petitdemange, H. (1995) Isolation and characterization of mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4413–4417.
- Abeles, R.H., Brownstein, A.M. and Randles, C.H. (1960)  $\beta$ -hydroxypropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-propanediol by *Aerobacter aerogenes*. *Biochimica et Biophysica Acta* 41, 530–531.
- Axelsson, L., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. and Lindgren, S.E. (1989) Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2, 131–136.
- Barbirato, F., Larguier, A., Conte, T., Astruc, S. and Bories, A. (1997) Sensitivity to pH, product inhibition, and inhibition by  $\text{NAD}^+$  of 1,3-propanediol dehydrogenase purified from *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210. *Archives of Microbiology* 168, 160–163.
- Biebl, H., Marten, S., Hippe, H. and Deckwer, W.D. (1992) Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated *Clostridia*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36, 592–597.
- Biebl, H. and Pfenning, N. (1982) Isolation of members of the family Rhodospirillaceae. In *The Prokaryotes* ed. Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G. pp. 267–273. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Daniel, R., Boenigk, R. and Gottschalk, G. (1995a) Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpression of the corresponding gene in *E. coli*. *Journal of Bacteriology* 177, 2151–2156.
- Daniel, R. and Gottschalk, G. (1992) Growth temperature dependent activity of glycerol dehydratase in *E. coli* expressing the *C. freundii* dha regulon. *FEMS Microbiology Letters* 100, 281–286.
- Daniel, R., Stuert, K. and Gottschalk, G. (1995b) Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. *Journal of Bacteriology* 177, 4392–4401.
- Forage, R.G. and Foster, M.A. (1982) Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme  $\text{B}_{12}$ -dependent glycerol and diol dehydratase. *Journal of Bacteriology* 149, 413–419.
- Heyndrickx, M., Devos, P., Vacanneyt, M. and Deley, J. (1991) The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212  $t_2$  and *Clostridium pasteurianum* LMG 3285. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34, 637–642.
- Johnson, E.A. and Lin, E.C.C. (1987) *Klebsiella pneumoniae* 1,3-propanediol  $\text{NAD}^+$  oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* 169, 2050–2054.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folinphenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Luers, F., Seyfried, M., Daniel, R. and Gottschalk, G. (1997) Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters* 154, 337–345.
- Malaoui, H. and Marczak, R. (2000) Purification and characterization of the 1,3-propanediol dehydrogenase of *Clostridium butyricum* E5. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 399–405.
- Marshall, J.H., May, J.W. and Sloan, J. (1985) Purification and properties of glycerol:  $\text{NAD}^+$  2-oxidoreductase (Glycerol dehydrogenase) from *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of General Microbiology* 131, 1581–1588.
- Ruch, F.E., Lin, E.C.C., Kowitz, J.D., Tang, C.T. and Goldberg, A.L. (1980) In vivo inactivation of glycerol dehydrogenase in *Klebsiella aerogenes*: properties of active and inactivated proteins. *Journal of Bacteriology* 141, 1077–1085.
- Scharschmidt, M., Pfeleiderer, G., Metz, H. and Brummer, W. (1983) Isolation and characterization of glycerol dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Hoppe Seylers Z Physiological Chemistry* 364, 911–921.
- Spencer, P., Bown, K.J., Scawen, M.D., Atkinson, T. and Gore, M.G. (1989) Isolation and characterization of the glycerol dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 994, 270–279.
- Talarico, T.L., Axelsson, L.T., Novotny, J., Fiuza, M. and Dobrogosz, W.J. (1990) Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol:  $\text{NAD}^+$  oxidoreductase. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 943–948.
- Tang, C.T., Ruch, F.E. J.R., and Lin, E.C.C. (1979) Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase that serves an *Escherichia coli* mutant for glycerol catabolism. *Journal of Bacteriology* 140, 182–187.
- Veiga-Da-Cunha, M. and Foster, M.A. (1992) 1,3-propanediol:  $\text{NAD}^+$  oxidoreductase of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2005–2010.

### 3. CONCLUSION

La méthode de filtration sur gel (FPLC) nous a permis de séparer les deux activités enzymatiques 1,3-propanediol déshydrogénase et glycérol déshydrogénase en fonction de leur masse moléculaire chez *C. butyricum* E5, sauvage et mutant D.

Cette séparation physique nous a permis ainsi de caractériser chaque enzyme et de déterminer leurs propriétés cinétiques.

Les deux activités des deux souches étudiées possèdent des propriétés similaires telle que le pH optimum, la spécificité de substrat et l'activation par le cation  $Mn^{2+}$ .

Cependant, l'activité 1,3-PPD déshydrogénase chez la souche mutante présente l'avantage comparé à la souche sauvage d'avoir une faible affinité pour son substrat physiologique, le 3-HPA, produit intermédiaire du métabolisme du glycérol et toxique. Ceci rend la souche mutante moins sensible et donc plus résistante à l'effet toxique du 3-HPA.

Les deux souches peuvent utiliser le glycérol à un haut niveau puisque leur glycérol déshydrogénase a un  $K_m$  élevé pour le glycérol.

Ces propriétés conduisent à la conclusion que *C. butyricum* E5 mutant D est le meilleur candidat biotechnologique jusqu'à présent pour la bioconversion du glycérol en 1,3-PPD.



**CONCLUSIONS  
ET  
PERSPECTIVES**

## Chapitre IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

*Clostridium butyricum* a la possibilité de produire, à partir du glycérol, du 1,3-propanediol qui est un composé à forte valeur ajoutée de l'industrie chimique. Il est en général produit difficilement et avec un coût élevé. Le 1,3-propanediol a de nombreuses applications notamment comme molécule de base pour la production de polymères biodégradables. L'utilisation du glycérol par *C. butyricum* est assurée grâce à la répartition du flux carboné au niveau de deux branchements métaboliques: le premier conduit du glycérol au 1,3-PPD et au glycéraldéhyde-3-phosphate ; le second de l'acétyl-CoA à l'acétate et au butyrate. Il est clair que :

- ✓ La voie glycérol - 1,3-propanediol ne produit ni composé énergétique ni éléments réducteurs.
- ✓ La voie glycérol - acétate est indispensable pour produire l'énergie nécessaire à la croissance ainsi que le NADH.
- ✓ La voie acétyl-CoA-butyrat e devrait être limitée puisqu'elle concurrence la 1,3-propanediol déshydrogénase dans l'utilisation du NADH.
- ✓ Un mutant hydrogénase moins devrait produire plus de NADH puisque les éléments réducteurs sont conservés grâce à l'activité NAD<sup>+</sup> ferrédoxine réductasique.

Des résultats précédents ont montré que :

- Un mutant hydrogénase moins ne produit pas plus de 1,3-propanediol mais augmente sa production de butyrat e.
- Un mutant butyrat e moins n'augmente pas non plus la quantité de 1,3-propanediol mais augmente sa production d'hydrogène et d'acétate.
- Les régulations des flux carbonés et des éléments réducteurs s'effectuent toujours au niveau de la deuxième branche métabolique à savoir celle qui conduit à l'acétate et au butyrat e alors qu'une très grande rigidité est présente au niveau du premier branchement qui conduit au glycéraldéhyde-3-phosphate et au 1,3-propanediol.
- La teneur intracellulaire en acétyl-CoA oriente les flux soit vers la production de butyrat e (aux faibles teneurs en acétyl-CoA) soit vers la production d'acétate (aux fortes teneurs en acétyl-CoA).

- La concentration intracellulaire en NADH est toujours élevée et ce coenzyme ne limite pas la production de 1,3-propanediol.

Dans notre travail nous avons montré que lorsque *C. butyricum* DSM 5431 est cultivée en continu à fort taux de dilution ( $0,30 \text{ h}^{-1}$ ) le glycérol s'accumule puisque seulement 60% du substrat présent dans l'alimentation est utilisé. L'apport d'un co-substrat tel que le glycéraldéhyde au milieu de culture à des concentrations de l'ordre de 0,5 à 2 mM n'est pas toxique et permet à la cellule d'utiliser la totalité du glycérol ; cette consommation s'accompagne d'une augmentation de la biomasse ainsi que de la concentration en métabolites. Le phénomène s'explique si l'on prend en considération le fait que le glycéraldéhyde est également un substrat de la 1,3-propanediol déshydrogénase, ce qui a pour résultat d'utiliser une partie du NADH intracellulaire et de faire chuter de moitié le rapport NADH/NAD<sup>+</sup>. L'étude de l'effet du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> sur l'activité GAPDH in vitro montre que cette enzyme fonctionne à 10% de son activité maximale lorsque le rapport est de 4,4 alors que le taux monte à 50% lorsque le rapport est de 2,3.

Ce travail montre donc le rôle du NADH dans la régulation du flux carboné via la glycolyse et également le caractère non limitant de l'activité 1,3-propanediol déshydrogénase puisque le glycéraldéhyde est entièrement utilisé ; l'élément limitant est le substrat physiologique à savoir le 3-HPA. Dans ce cas, des deux enzymes qui conduisent du glycérol au 1,3-PPD, l'activité glycérol déshydratase est l'étape limitante de cette bioconversion. C'est le moyen sélectionné par *C. butyricum* pour éviter une accumulation éventuelle du 3-HPA, néfaste à son développement. La récente disponibilité du 3-HPA pourrait aujourd'hui permettre d'appréhender quantitativement les phénomènes d'inhibitions et de rechercher des conditions dans lesquelles ce composé limite le moins possible l'activité glycérol déshydratase.

Puisque des concentrations intracellulaires de NADH élevées sont mesurées chez *C. butyricum*, il est nécessaire de s'interroger sur les régulations qui s'exercent sur le système NADH-ferrédoxine-oxydoréductasique. Les bilans métaboliques démontrent que, lors de cultures sur glucose, l'évacuation des éléments réducteurs s'effectue via l'activité NADH-ferrédoxine-réductasique et que l'hydrogénase fonctionne. A l'inverse, cette voie métabolique ne fonctionne plus lors de cultures sur glycérol alors que seule l'activité ferrédoxine-NAD<sup>+</sup> réductasique est utilisée. Nous sommes ici en présence d'une régulation originale dont le but est très certainement d'éviter une réoxydation du NADH par le système NADH-ferrédoxine-hydrogénase ce qui éliminerait de fait la protection de la cellule vis-à-vis du 3-HPA.

L'accumulation de l'acétyl-CoA en fonction de l'augmentation du flux carboné indique que la cinétique d'élimination de ce composé vers la production de butyrate ou d'acétate est insuffisante. Néanmoins cet acétyl-CoA intracellulaire a moins d'influence que le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> sur l'utilisation du glycérol. Il est intéressant de noter que l'augmentation du flux carboné s'accompagne non seulement d'un accroissement du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> mais également d'une augmentation du pool NAD<sup>+</sup> + NADH. Il en résulte des teneurs intracellulaires particulièrement élevées et qui ne pourront être expliquées que par une étude de la biosynthèse du NAD<sup>+</sup>. L'augmentation du pool NAD<sup>+</sup> + NADH pourrait s'expliquer par une augmentation concomitante de la biosynthèse des apoenzymes mais notre étude démontre que ce n'est pas le cas puisque les activités spécifiques mesurées sont constantes ; il reste donc à expliquer cette biosynthèse de coenzymes indépendante de la biosynthèse des oxydoréductases.

Lorsque le glucose est la seule source de carbone et d'énergie, le flux métabolique est seulement divisé au niveau de la pyruvate déshydrogénase. Le pool en acétyl-CoA étant dans ce cas très élevé, la NADH-ferrédoxine oxydoréductase a donc une activité principalement réductasique. De plus la production d'hydrogène, via l'hydrogénase, étant la principale voie de réoxydation de la ferrédoxine réduite, l'excès de NADH formé au cours de la glycolyse est ainsi éliminé.

Lorsque le glycérol est catabolisé, le flux de carbone est divisé à deux niveaux. Tout d'abord, au niveau du premier branchement où 60% du glycérol est transformé en 1,3-PPD. Le reste du flux métabolique est ensuite redivisé au niveau de la pyruvate-ferrédoxine-oxydoréductase. Dans ce cas, le pool en acétyl-CoA étant plus faible, il en résulte une plus faible production d'hydrogène due à l'oxydation de la ferrédoxine réduite par la Fd-NAD<sup>+</sup> réductase (diminution de l'activité hydrogénase) qui devient une autre voie de formation du NADH. De plus, le pool en NADH intracellulaire étant élevé dans cette culture, les activités des enzymes NAD<sup>+</sup> dépendantes, comme la 1,3-propanediol déshydrogénase, sont favorisées.

Dans ce travail, nous avons pu montrer que l'ajout de glucose à une culture continue de *C. butyricum* E5 sauvage ou mutant sur glycérol améliore le rendement de bioconversion du glycérol en 1,3-PPD en déviant le flux carboné du glycérol de la voie oxydative vers la voie réductrice (voie de formation du 1,3-PPD). Ce rendement passe de 0,63 à 0,89 pour la souche sauvage et de 0,50 à 0,80 pour la souche mutante. Cependant, au delà d'un seuil correspondant à une valeur du rapport molaire glucose/glycérol égale à 0,2, l'amélioration du rendement en 1,3-PPD ne se produit pas en raison d'une répression catabolique par le glucose.

Les connaissances sur les régulations métaboliques et sur les spécificités des enzymes permettent d'envisager une déviation du flux carboné du glucose vers le 1,3-propanediol. Le fait que le glycérol représente actuellement la seule source de carbone pour produire le 1,3-PPD constitue un inconvénient majeur au développement de cette filière. En effet, les quantités de glycérol annuelles disponibles sont très fluctuantes, c'est pourquoi nous souhaitons produire du 1,3-PPD grâce à l'ingénierie métabolique à partir du glucose qui, lui, sous la forme d'hydrolysat d'amidon est disponible en très grande quantité et à bas prix.

Les enzymes clés qui participent au catabolisme du glycérol sont la 1,3-propanediol déshydrogénase et la glycérol déshydrogénase. Nous avons purifié la première enzyme dans des conditions anaérobies jusqu'à homogénéité chez *C. butyricum* E5 cultivé sur glycérol en chemostat. Cette enzyme purifiée possède des caractéristiques physico-chimiques semblables à celles de *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* et *Clostridium pasteurianum*.

La seconde enzyme a été partiellement purifiée par les mêmes techniques et dans les mêmes conditions que la 1,3-propanediol déshydrogénase.

Nous avons étudié également les propriétés de ces deux enzymes du régulon *dha* qui interviennent dans le métabolisme du glycérol chez *C. butyricum* E5 sauvage et mutant D, résistant à l'alcool allylique. Elles ont été dans un premier temps séparées sur la base de leur taille moléculaire par filtration sur gel dans deux fractions différentes et récupérées pour différents tests. La 1,3-propanediol déshydrogénase et la glycérol déshydrogénase ont été purifiées lors de cette seule étape 5 fois avec un rendement respectif de 52% et 38%. A partir de ces deux fractions différentes, diverses déterminations ont été effectuées: le pH optimum, les paramètres cinétiques, la spécificité de substrat et l'effet des cations.

D'après l'étude des propriétés de ces deux enzymes, nous arrivons à la conclusion que la souche mutante E5 est le meilleur candidat biotechnologique pour la bioconversion du glycérol en 1,3-propanediol.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

### A

Abbad-Andaloussi, S., Manginot-Dürr, C., Amine, J., Petitedemange, E. and Petitedemange, H. (1995) Isolation and characterization of mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 4413-4417.

Abbad-Andaloussi, S., Amine, J., Gerard, P. and Petitedemange, E. (1996a) Properties of allyl alcohol mutants of *Clostridium butyricum* grown on glycerol. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3499-3501.

Abbad-Andaloussi, S., Dürr, C., Raval, G. and Petitedemange, H. (1996b) Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. *Microbiology* **142**, 1149-1158.

Abbad-Andaloussi, S., Guedon, E., Spiecer, E. and Petitedemange, H. (1996c) Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1,3-PPD production by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *Letters in Applied Microbiology* **22**, 311-314.

Abbad-Andaloussi, S., Amine, J., Gerard, P. and Petitedemange, H. (1998) Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 515-522.

Abbe, K., Takahashi, S. and Yamada, T. (1982) Involvement of oxygen-sensitive pyruvate formate-lyase in mixed-acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *Journal of Bacteriology* **152**, 175-182.

Abeles, R.H., Brownstein, A.M. and Randles, C.H. (1960)  $\beta$ -Hydroxypropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-propanediol by *Aerobacter aerogenes*. *Biochimica and Biophysica Acta* **41**, 530-531.

Abeles, R.H. and Lee, H.A. (1961) An intramolecular oxidation-reduction requiring a cobamide coenzyme. *Journal of Biological Chemistry* **236**, 2347-2350.

Aceves-Pina, E., Ortega, M.V. and Artis, M. (1974) Linkage of the *Salmonella typhimurium* chromosomal loci encoding for the cytochrome-linked L- $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and amyloamylase activities. *Archives of Microbiology* **101**, 59-70.

Agarwal, G.P. (1993) Glycerol. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **41**, 95-128.

Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K. and Adachi, O. (1985) Solubilization, purification and properties of membrane-bound glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**, 1001-1010.

Asnis, R.E. and Brodie, A.F. (1953) A glycerol dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **203**, 153-159.

Asnis, R.E., Vely, V.G. and Click, M.C. (1956) Some enzymatic activities of a particulate fraction from sonic lysates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **72**, 314-319.

Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. and Lindgren, S.E. (1989) Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* **2**, 131-136.

## B

Bahl, H., Andersch, W., Braun, K. and Gottschalk, G. (1982) Effect of pH and butyrate concentrations on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **14**, 17-20.

Balch, W.E., Schoberth, S., Tanner, R.S. and Wolfe, R.S. (1977) *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing carbone dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **27**, 355-361.

Barbirato, F., Camarasa-Claret, C., Grivet, J.P. and Bories, A. (1995) Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**, 786-793.

Barbirato, F., Grivet, J.P., Soucaille, P. and Bories, A. (1996) 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by Enterobacterial species. *Applied Environmental Microbiology* **62**, 1448-1451.

Barbirato, F., Larguier, A., Conte, T., Astruc, S. and Bories, A. (1997a) Sensitivity to pH, product inhibition, and inhibition by NAD<sup>+</sup> of 1,3-propanediol dehydrogenase purified from *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210. *Archives of Microbiology* **168**, 160-163.

Barbirato, F., Astruc, S., Soucaille, P., Camarasa, C., Salmon, J.M. and Bories, A. (1997b) Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: limitations and regulations. *Microbiology* **143**, 2423-32.

Baronofsky, J.J., Schreurs, W.J.A. and Kashket, E.R. (1984) Uncoupling by acetic acid limits growth and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 1134-1139.

Behrens, S., Mitchell, W.J. and Bahl, H. (2001) Molecular analysis of the mannitol operon of *Clostridium acetobutylicum* encoding a phosphotransferase system and a putative PTS-modulated regulator. *Microbiology* **147**, 75-86.

Beijer, L., Nilsson, R.P., Holmberg, C. and Rutberg, L. (1993) The *glpP* and *glpF* genes of the glycerol regulon in *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology* **139**, 349-359.



Biebl, H. and Pfenning, N. (1982) Isolation of members of the family Rhodospirillaceae. In: (Starr, M.P., Stolp, H.G., Truper, A., Balows, A., and Schlegel, H.G., editors) *The procaryotes*. New York: Springer, pp. 267-73.

Biebl, H. (1991) Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Applied Microbiology and Biotechnology* **35**, 701-705.

Biebl, H., Marten, S., Hippe, H. and Deckwer, W.D. (1992) Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated Clostridia. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**, 592-597.

Biebl, H. and Marten, S. (1995) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol: use of cosubstrates. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**, 15-19

Biondi, A.C., Feliz, M.R. and Disalvo, E.A. (1991) Surface changes induced by osmotic stress and its influence on the glycerol permeability in lipid bilayers. *Biochimica and Biophysica Acta* **1069**, 5-13.

Birkmann, A., Zinoni, F., Sawers, G. and Böck, A. (1987) Factors affecting transcriptional regulation of the formate-hydrogen-lyase pathway of *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* **148**, 44-51.

Böck, A. and Neidhardt, F.C. (1966) Properties of a mutant of *Escherichia coli* with temperature sensitive fructose-1,6-diphosphate. *Journal of Bacteriology* **92**, 470-476.

Boenigk, R. (1991) Optimierung der 1,3-propanediolbildung mit *Citrobacter freundii* und Isolierung und Charakterisierung der 1,3-propanediol dehydrogenase. Doctoral Thesis, Georg-August-Universität, Göttingen.

Boenigk, R., Bowien, S. and Gottschalk, G. (1993) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**, 453-457.

Bories, A., Claret, C. and Soucaille, P. (1991) Kinetic study and optimisation of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochemistry* **26**, 243-248.

Bories, A. and Claret, C. (1992) Procédés pour l'obtention de produits à activité bactérienne, capable de transformer le glycérol en 1,3-propanediol, souches correspondantes et application à la production industrielle de 1,3-propanediol. Brevet Français n° FR 53076 C

Bouvet, O.M.M., Lenormand, P., Carlier, J.P. and Grimont, P.A.D. (1994) Phenotypic diversity of anaerobic glycerol dissimilation shown by seven enterobacterial species. *Research in Microbiology* **145**, 129-139.

Bouvet, O.M.M., Lenormand, P., Ageron, E. and Grimont, P.A.D. (1995) Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the *Enterobacteriaceae*. *Research in Microbiology* **146**, 279-90.

Bovell, C.R., Packer, L. and Helgerson, R. (1963) Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light-scattering. *Biochimica and Biophysica Acta* **75**, 257-266.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

Branlant, C., Krol, A., Machatt, A. and Ebel, J.P. (1981) *Nucleic Acids Research* **9**, 293-307.

Brown, T.D.K., Jones-Mortiner, M.C. and Kornberg, H.L. (1977) The enzymic interconversion of acetate and acetyl-CoA in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **102**, 327-336.

Bystrykh, L.V. and Trotsenko, I.A. (1983) Purification and several properties of dihydroxyacetone kinase from the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biokhimiia* **48**, 1611-1616.

## C

Calmes, D., Deal, R.J. (1972) Glycerol transport by *Nocardia asteroides*. *Canadian Journal of Microbiology* **18**, 1703-1708.

Carlsson, J., Kujala, U. and Edlung, M.B.K. (1985) Pyruvate dehydrogenase activity in *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity* **49**, 674-678.

Cartwright, C.P., Juroszek, J.R., Beavan, M.J., Ruby, F.M.S., de Moraes, S.M.F. and Rose, A.H. (1986) Ethanol dissipates the proton-motive forces across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* **132**, 369-377.

Castro, I.M. and Loureiro-Dias, M.C. (1991) Glycerol utilization in *Fusarium oxysporum* var. *lini* : regulation of transport and metabolism. *Journal of General Microbiology* **137**, 1497-1502.

Chatelain, R. (1969) Réduction des nitrites par *Alcaligenes odorans* var. *viridans*. *Annales de l'Institut Pasteur Paris* **116**, 498-500.

Chen, Y.M. and Lin, E.C.C. (1991) Regulation of the *adhE* gene, which encodes ethanol dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **173**, 8009-8013.

Chevalier, M., Lin, E.C.C. and Levine, R.L. (1990) Hydrogen peroxide mediates the oxidative inactivation of enzymes following the switch from anaerobic to aerobic metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 40-46.

Chung, T.C., Axelsson, L. Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. (1989) In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* **2**, 259-262.

Claret, C. (1992) Métabolismes oxydatifs et fermentaires du glycérol chez les bactéries. Etude physiologique et cinétique de sa conversion en dihydroxyacétone et en 1,3-propanediol. Thèse Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées (INSA) Toulouse.

- Claridge, C.A. and Hendlin, D. (1962) Oxidation of glycerol by *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* **84**, 1181-1186.
- Clark, D. and Cronan, J.E. (1980) *Escherichia coli* mutants with altered control of alcohol dehydrogenase and nitrate reductase. *Journal of Bacteriology* **141**, 177-183.
- Clark, D.P. (1989) The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiological Reviews* **63**, 223-234.
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Ahmed, S., Honore, N., Elmes, L., Anderson, W.F. and Weiner, J.H. (1988) Nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships of the *glpABC* operon encoding the anaerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **170**, 2448-2456.
- Collins, E.B. (1972) Biosynthesis of flavor compound by microorganisms. *Journal of Dairy Sciences* **55**, 1022-1028.
- Connor Johnson, B., Stroinski, A. and Schneider, Z. (1975) Glycerol dehydratase from *Aerobacter aerogenes*. *Methods in Enzymology* **42**, 315-323.
- Cooper, R.A. and Anderson, A. (1970) The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **11**, 273-276.
- Cooper, R.A. (1975) *Methods in Enzymology* **41B**, 502-508. Cité par Cooper (1984).
- Cooper, R.A. (1984) Metabolism of methylglyoxal in microorganisms. *Annual Review of Microbiology* **38**, 49-68.
- Courtright, J.B. (1975a) Differential rates of synthesis of glycerokinase and glycerophosphate dehydrogenase in *Neurospora crassa* during induction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **167**, 34-44.
- Courtright, J.B. (1975b) Intracellular localization and properties of glycerokinase and glycerophosphate dehydrogenase in *Neurospora crassa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **167**, 21-33.
- Cozzarelli, N.R., Koch, J.P. and Lin, E.C.C. (1965) Growth stasis by accumulated L- $\alpha$ -glycerophosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **90**, 1325-1329.
- Cozzarelli, N.R., Freedberg, W.D. and Lin, E.C.C. (1968) Genetic control of the L- $\alpha$ -glycerophosphate system in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **31**, 371-387.
- Crabbendam, P.M., Neijssel, O.M. and Tempest, D.W. (1985) Metabolic and energetic aspects of the growth of *Clostridium butyricum* on glucose in chemostat culture. *Archives of Microbiology* **142**, 375-382.

## D

- Dabrock, B., Bahl, H. and Gottschalk, G. (1992) Parameters effecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1233-1239.
- Daniel, R. and Gottschalk, G. (1992) Growth temperature dependent activity of glycerol dehydratase in *E. coli* expressing the *C. freundii* dha regulon. *FEMS Microbiology Letters* **100**, 281-286.
- Daniel, R., Boenigk, R. and Gottschalk, G. (1995a) Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpression of the corresponding gene in *E. coli*. *Journal of Bacteriology* **177**, 2151-2156.
- Daniel, R., Stuert, K. and Gottschalk, G. (1995b) Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. *Journal of Bacteriology* **177** (15), 4392-4401.
- Davison, S.P., Santangelo, J.D., Reid, S.J. and Woods, D.R. (1995) A *Clostridium acetobutylicum* regulation gene (reg A) affecting amylase production in *Bacillus subtilis*. *Microbiology U.K.* **141**, 989-996.
- De Boer, M., Broekhuizen, C.P. and Postma, P.W. (1986) Regulation of glycerol kinase by enzyme III<sup>glc</sup> of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Journal of Bacteriology* **167**, 393-395.
- Decker, K. (1965) Acetyl-CoA. In *Methods of enzymatic analysis*. Edited by H. U. Bergmeyer, 2<sup>nd</sup> edn. N. Y. and London, Verlag Chemie Academic press, pp. 419-424
- Deckwer, W.D. (1995) Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. *FEMS Microbiological Reviews* **16**, 143-149.
- Deckwer, W.D., Günzel, B., Biebl, H., Müller, R.H. and Carduck, F.J. (1992) Glycerol conversion to 1,3-propanediol a versatile component for biodegradable plastics. In: 7<sup>th</sup> European Conference on Biomass for Energy and Environment, Agriculture and Industry. 5-9 Octobre. Florence, Italie.
- De Vos, P., Stevens, P. and De Ley, J. (1983) Hydrogen gas production from formate and glucose by different members of the *Enterobacteriaceae*. *Biotechnology Letters* **5**, 69-74.
- Diez Gonzales, F. and Russell, J.B. (1996) The regulation of thiomethylgalactoside transport in *Clostridium acetobutylicum* P262 by inducer exclusion and inducer expulsion mechanisms. *FEMS Microbiology Letters* **136**, 123-127.
- Doëlle, H.W. (1975) *Bacterial metabolism*, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, Inc., New York.
- Drake, H.L., Hu, S.I. and Wood, H.G. (1981) Purification of five components from *Clostridium thermoaceticum* which catalysed synthesis of acetate from pyruvate and methyltetrahydrofolate; properties of phosphotransacetylase. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 11137-11144.

## E

Eden, G. and Fuchs, G. (1983) Autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Acetobacterium woodii*: II. Demonstration of enzymes involved. *Archives of Microbiology* **135**, 68-73.

Együd, L.G. and Szent-Györgyi, A. (1966) On the regulation of cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **56**, 203-207.

Ehrmann, M., Boos, W., Ormseth, E., Schweizer, H. and Larson, T.J. (1987) Divergent transcription of the sn-glycerol-3-phosphate active transport (*glpT*) and anaerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpAglpCglpB*) genes of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **169**, 526-532.

Eichler, B. and Schink, B. (1984) Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicus* sp nov, a homoacetogenic anaerobe. *Archives of Microbiology* **140**, 147-152.

Elm, R., Fable, J., Hahn, H.D. and Gelbke, H.P. (1980) Propanediol. In: Bartholomé E, Hellmann H, Ley H, Weigert M, Weisse E (eds) Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, vol. **19**. Verlag Chemie, Weinheim.

El-Ziney, M.G., Arneborg, N., Uyttendaele, M., Debevere, J. and Jakobsen, M. (1989) Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous culture. *Biotechnology Letters* **20**, 913-916.

Emde, R. and Schink, B. (1987) Fermentation of triacetin and glycerol by *Acetobacterium* sp. No energy is conserved by acetate excretion. *Archives of Microbiology* **149**, 142-148.

Ewing, W.H. and Fife, M.A. (1972) *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck) comb. Nov. (the Herbicola-Lathyri bacteria). *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **22**, 4-11.

## F

Ferdinand, W. (1964) The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochemical Journal* **92**, 578-585.

Fond, O., Matta-Ammouri, G., Petitdemange, H. and Engasser, J.M. (1985a) The role of acids on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **22**, 195-200.

Fond, O., Jansen, N.B. and Tsao, G.T. (1985b) A model of acetic acid and 2,3-butanediol inhibition of the growth and metabolism of *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnology Letters* **7**, 727-732.

Forage, R.G. and Foster, M.A. (1979) Resolution of the coenzyme B12-dependent dehydratases of *Klebsiella* sp. and *Citrobacter freundii*. *Biochimica and Biophysica Acta* **569**, 249-258.

Forage, R.G. and Foster, M.A. (1982) Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B 12-dependent glycerol and diol dehydratase. *Journal of Bacteriology* **149**, 413-419.

Forage, R.G., and Lin, E.E.C. (1982) dha system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. *Journal of Bacteriology* **151**, 591-599.

Forsberg, C.W. (1987) Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other species. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 639-643.

Fox, D.K. and Roseman, S. (1986) Isolation and characterization of homogeneous acetate kinase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 13487-13497.

Fraenkel, D.G. and Vinopal, R.T. (1973) Carbohydrate metabolism in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **27**, 69-100.

Freedberg, W.B., Kistler, W.S. and Lin, E.C.C. (1971) Lethal synythesis of methylglyoxal by *Escherichia coli* during unregulated glycerol metabolism. *Journal of Bacteriology* **108**, 137-144.

Freedberg, W.B. W.S. and Lin, E.C.C. (1973) Three kinds of controls affecting the expression of the glp regulon in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **115**, 816-823.

Freier, D. and Gottschalk, G. (1987) L(+)-lactate dehydrogenase of *Clostridium acetobutylicum* is activated by fructose-1,6-biphosphate. *FEMS Microbiology Letters* **43**, 229-233.

Frey, M., Rothe, M., Volker Wagner, A.F. and Knappe, J. (1994) Adenosylmethionine-dependent synthesis of the glycy radical in pyruvate formate-lyase by abstraction of the glycine C-2 pro-S hydrogen atom. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 12432-12437.

## G

Gancedo, C., Gancedo, J.M. and Sols, A. (1968) Glycerol metabolism in yeasts: pathways of utilization and production. *European Journal of Biochemistry* **5**, 165-172.

Gavard, R., Hautecoeur, B. and Descourtieux, H. (1957) Phosphotransbutyrylase de *Clostridium acetobutylicum*. *Comptes rendus de l'académie des sciences, Paris*. **244**, 2323-2326.

Girbal, L. (1994) Etude biochimique et physiologique de la production de solvants chez *Clostridium acetobutylicum*. Thèse Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées (INSA) Toulouse.

Girbal, L., and Soucaille, P. (1994) Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures, role of NADH/NAD<sup>+</sup> ratio and ATP pool. *Journal of Bacteriology* **176**, 6433-6438.

Girbal, L., Vasconcelos, I. and Soucaille, P. (1994) Transmembrane pH of *Clostridium acetobutylicum* is inverted (more acidic inside) when the in vivo activity of hydrogenase is decreased. *Journal of Bacteriology* **176**, 6146-6147.

Goldman, D.S. (1963) Enzyme systems in the Mycobacteria : initial steps in the metabolism of glycerol. *Journal of Bacteriology* **86**, 30-37.

Goncedo, C. and Serrano, R. (1989) Energy-yielding metabolism. In: "The yeast". Ed. by Rose and Harrison, Academic Press, pp 205-259.

Goodlove, P.E., Cunningham, P.R., Parker, J. and Clark, D.P. (1989) Cloning and sequence analysis of the fermentative alcohol-dehydrogenase-encoding gene of *Escherichia coli*. *Gene* **85**, 209-214

Gottschalk, G. and Andressen, J.R. (1979) Energy metabolism in anaerobes. In: "International Review of Biochemistry and Microbial Chemistry". Ed by Quayle, University Park Press. **vol. 21**.

Gottschalk, G. (1987) Bacterial metabolism. Springer, Berlin Heidelberg, New York, USA

Gottschalk, G. and Averhoff, B. (1990) Process for the microbiological preparation of 1,3-propanediol from glycerol. Brevet européen n° 0 373 230 A1.

Gray, W.D. and Sova, C. (1956) Relation of molecule size and structure to alcohol inhibition of glucose utilization by yeast. *Journal of Bacteriology* **72**, 349-359.

Günzel, B. (1991) Mikrobielle herstellung von 1,3-propanediol durch *Clostridium butyricum* und adsorptive aufarbeitung von diolen. Ph.D. thesis. University of Braunschweig.

Günzel, B., Yonsel, S. and Deckwer, W.D. (1991) Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m<sup>3</sup>. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**, 289-294.

## H

Haddock, B.A. and Jones, C.W. (1977) Bacterial respiration. *Bacteriological Reviews* **41**, 47-99.

Hansen, R.G. and Henning, U. (1966) Regulation of pyruvate dehydrogenase activity in *Escherichia coli* K12. *Biochimica and Biophysica Acta* **122**, 355-358.

Hartmanis, M.G. and Stadtman, T.C. (1986) Diol metabolism and diol dehydratase in *Clostridium glycolicum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **245**, 144-52.

Hartmanis, M.G. (1987) Butyrate kinase from *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 617-621.

Hauge, J.G., King, T.E. and Cheldelin, V.H. (1955) Alternate conversions of glycerol to dihydroxyacetone in *Aerobacter suboxydans*. *Journal of Biological Chemistry* **214**, 1-9.

- Hayashi, S.I., Koch, J.P. and Lin, E.C.C. (1964) Active transport of L- $\alpha$ -glycerophosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **239**, 3098-3105.
- Hayashi, S.I. and Lin, E.C.C. (1965a) Product induction of glycerol kinase in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **14**, 515-521.
- Hayashi, S.I. and Lin, E.C.C. (1965b) Capture of glycerol by cells of *Escherichia coli*. *Biochimica and Biophysica Acta* **94**, 479-487.
- Hayashi, S.I. and Lin, E.C.C. (1967) Purification and properties of glycerol kinase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **242**, 1030-1035.
- Hayakaiwa, T. and Koike, M. (1967) *Journal of Biological Chemistry* **242**, 1356.
- Hermann, H., Popoff, M.R. and Sebald, M. (1987) *Sporomusa paucivorans* sp nov, a methalotrophic bacterium that forms acetic acid from hydrogen and carbon dioxide. *International Journal of Systematic Bacteriology* **159**, 1040-1046.
- Hernandez, E. and Johnson, M.J. (1967) Anaerobic growth yields of *Aerobacter cloacea* and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **94**, 991-995.
- Herrero, A.A., Gomez, R.F., Snedecor, B., Tolman, C.J. and Roberts, M.F. (1985) Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids: a mechanism based on uncoupling by weak acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* **22**, 53-62.
- Heyndrickx, M., Vansteenbeeck, A., De Vos, P. and De ley, J. (1986) Hydrogen gas production from continuous fermentation of glucose in a minimal medium with *Clostridium butyricum* LMG 1213t1. *Systematic and Applied Microbiology* **8**, 239-244.
- Heyndrickx, M., De Vos, P., Speybrouk, A. and De ley, J. (1989) Fermentation of mannitol by *Clostridium butyricum*: role of acetate as an external hydrogen acceptor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**, 323-328.
- Heyndrickx, M., De Vos P., Vancanneyt, M. and De Ley, J. (1991a) The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212 t2 and *Clostridium pasteurianum* LMG 3285. *Applied Microbiology and Biotechnology* **34**, 637-642.
- Heyndrickx, M., De Vos P. and De Ley, J. (1991b) Fermentation characteristics of *Clostridium pasteurianum* LMG 3285 grown on glucose and mannitol. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 52-58.
- Hobson, P.N. and Mann, S.O. (1961) The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *Journal of General Microbiology* **25**, 227-240.
- Homann, T., Tag, C., Biebl, H., Deckwer, W.D. and Schink, B. (1990) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **33**, 121-126.
- Hommel, F.A. (1966) Effect of glucose on the level of glycolytic enzyme activities in different yeast species. *Archives of Microbiology* **58**, 296-301.



Hopper, D.J. and Cooper, R.A. (1971) The regulation of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase: a new control site in glycolysis. *FEBS Letters* **13**, 213-216.

Huesmann, M. and Papoutsakis, E.T. (1986) Effect of acetoacetate, butyrate and uncoupling ionophore on growth and product formation of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Letters* **8**, 37-42.

Hunter, G.J.E. (1953) The oxidation of glycerol by Mycobacteria. *Journal of Biochemistry* **55**, 320-328.

Hunter, K. and Rose, A.H. (1971) Yeast lipids and membranes. In: "The Yeast". Ed. By Rose and Harrison, London and New York Academic Press. **Vol 2**, pp 211-270.

## I

Inderlieb, C.B. and Delwiche, E.A. (1973) Nitrate reduction and the growth of *Veillonella alcalescens*. *Journal of Bacteriology* **114**, 1206-1212.

Ingram, L.O. (1976) Adaptation of membrane lipids to alcohols. *Journal of Bacteriology* **125**, 171-176.

Ingram, L.O. and Buttkle, T.M. (1984) Effects of alcohols on microorganisms. In: Advances in Microbiol Physiology. Ed. Academic Press. **Vol 25**, 254-304.

Ingram, L.O. (1986) Microbial tolerance to alcohols: role of the membrane. *Tibtech* 40-44.

Inoue, Y. and Kimura, A. (1995) Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms. In: Advances in Microbiol Physiology. Ed. Academic Press. **Vol 37**, 177-227.

Ishikawa, H., Nobayashi, H. and Tanaka, H. (1990) *Journal of Fermentation and Bioengineering* **70**, 34-40.

Iuchi, S. and Lin, E.C.C. (1988) arcA (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **84**, 3901-3905.

Iuchi, S., Cameron, D.C. and Lin, E.C.C. (1989) A second global regulator gene (arcB) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **171**, 868-873.

Iuchi, S., Cole, S.T. and Lin, E.C.C. (1990) Multiple regulatory elements for the glpA operon encoding anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase and the glpD operon encoding aerobic glycerol-3-P-dehydrogenase in *Escherichia coli*: Further characterization of respiratory control. *Journal of Bacteriology* **172**, 179-184.

Izard, A., Goma, G. and Soucaille, P. (1989) Effects of various alcoholic supplements on the growth rate of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**, 179-183.

## J

Jacobs, N.J. and Vandemark, P.J. (1960a) Comparison of the mechanism of glycerol oxidation in anaerobically and anaerobically grown *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* **79**, 532-538.

Jacobs, N.J. and Vandemark, P.J. (1960b) The purification and properties of the glycerophosphate-oxidizing enzyme of *Streptococcus faecalis* 10C1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **88**, 250-255.

Jain, M.K., Gleeson, J. and Upreti, G.G. (1978) Intrinsic perturbing ability of alkanols in lipid bilayers. *Biochimica and Biophysica Acta* **509**, 1-8.

Jin, R.Z., Forage, R.G. and Lin, E.C.C. (1982) Glycerol kinase as a substitute for dihydroxyacetone kinase in a mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **152**, 1303-1307.

Johnson, E.A., Burke, S.K., Forage, R.G. and Lin, E.C.C. (1984) Purification and properties of dihydroxyacetone kinase from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **160**, 55-60.

Johnson, E.A., Levine, R.L. and Lin, E.C.C. (1985) Inactivation of glycerol dehydrogenase of *Klebsiella pneumoniae* and the role of divalent cations. *Journal of Bacteriology* **164**, 479-483.

Johnson, E.A. and Lin, E.C.C. (1987) *Klebsiella pneumoniae* 1,3-propanediol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* **169**, 2050-2054.

Jones, H.M. and Gunsalus, R.P. (1987) Regulation of *Escherichia coli* fumarate reductase (*frdABCD*) operon expression by respiratory electron acceptors and the *fnr* gene product. *Journal of Bacteriology* **169**, 3340-3349.

Jones, R.P. (1989) Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* **11**, 130-153.

Junelles AM, Janati-Idrissi R, Petitdemange H, Gay R (1988) Iron effect on acetone-butanol fermentation. *Current Microbiology* **17**, 299-303.

Jungermann, K., Thauer, R.K. and Decker, K. (1971) Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-ferredoxin reductase system in *Clostridium Kluyveri*. *Journal of Biological Chemistry* **246**, 960-963.

Jungermann, K., Thauer, R.K., Leimenstoll, G. and Decker, K. (1973) Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic clostridia. *Biochimica and Biophysica Acta* **305**, 268-280.

## K

Karlson, P. (1971) Les lipides et leur métabolisme. Dans: "Biochimie" 2<sup>nd</sup> Edition. Ed. by Coin. Paris. 227-238.

Karube, I., Matzunaga, T., Tsuru, S. and Suzuki, S. (1976) Continuous hydrogen production by immobilized whole cells of *Clostridium butyricum*. *Biochimica and Biophysica Acta* **444**, 338-343.

Kerscher, L. and Oesterhelt, D. (1981) The catalytic mechanism of 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases from *Halobacterium halobium*. One-electron transfer at two distinct steps of the catalytic cycle. *European Journal of Biochemistry* **116**, 595-600.

Kerscher, L. and Oesterhelt, D. (1982) Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. New findings on an ancient enzyme. *Trends in Biochemical Sciences* **7**, 371-374.

King, T.E. and Cheldelin, V.H. (1952a) Phosphorylative and non phosphorylative oxidation in *Acetobacter suboxydans*. *Journal of Biological Chemistry* **198**, 135-141.

King, T.E. and Cheldelin, V.H. (1952b) Sources of energy and the dinitrophenol effect in the growth of *Acetobacter suboxydans*. *Journal of Bacteriology* **66**, 581-584.

Kistler, W.S., Hirsch, C.A., Cozzarelli, N.R. and Lin, E.C.C. (1969) Second pyridine nucleotide-independent L- $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **110**, 1133-1135.

Klingenberg, M. (1965) Nicotinamide-adenine dinucleotides (NAD, NADP, NADH, NADPH) spectrometric and fluorimetric methods. In *Methods of enzymatic analysis*, pp. 2045-2059. Edited by Bergmeyer, H. U. New York, Academic press.

Klungsoyr, L., King, T.E. and Cheldelin, V.H. (1957) Oxidative phosphorylation in *Acetobacter suboxydans*. *Journal of Biological Chemistry* **227**, 137-149.

Knappe, J., Schacht, J., Möckel, W., Höpner, Th., Vetter, H. and Edenharder, J.R. (1969) Pyruvate formate-lyase reaction in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **11**, 316-327.

Knappe, J., Blachkowski, H.P., Gröbner, P. and Schmitt, T. (1974) Pyruvate formate-lyase of *Escherichia coli*: the acetyl-enzyme intermediate. *European Journal of Biochemistry* **50**, 253-263.

Knappe, J., Neugebauer, F.A., Blaschkowski, H.P. and Gänzler, M. (1984) Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **81**, 1332-1335.

Knappe, J. and Sawers, G. (1990) A radical route to acetyl-CoA : the anaerobically induced pyruvate formate-lyase reaction of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **75**, 383-398.

Koch, J.P., Hayashi, S. and Lin, E.C.C. (1964) The control of the dissimilation of glycerol and L- $\alpha$ -glycerol-phosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **239**, 3106-3108.

Kremer, D.R. and Hansen, T.A. (1987) Glycerol and dihydroxyacetone dissimilation in *Desulfovibrio* strains. *Archives of Microbiology* **147**, 249-256.

Kretschmann, J., Carduck, F.J., Deckwer, W.D. and Tag, C. (1990) Fermentative herstellung von 1,3-propanediol. Brevet européen n° 0 361 082 A2.

Kristler, W.S. and Lin, E.C.C. (1971) Anaerobic L- $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* : its genetic locus and its physiological role. *Journal of Bacteriology* **108**, 1224-1234.

Krymkiewicz, N., Diéguez, E., Rekarte, U.D. and Zwaig, N. (1971) Properties and mode of action of a bactericidal compound (= methylglyoxal) produced by a mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **108**, 1338-1347.

Kun, E. (1950) Inhibition of succinic dehydrogenase by methylglyoxal. *Journal of Biological Chemistry* **192**, 187-289.

Kuritzkes, D.R., Zhang, Z.Y. and Lin, E.C.C. (1984) Use of (glp-lac) in studies of respiratory regulation of the *Escherichia coli* anaerobic sn-3-glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes (glpAB). *Journal of Bacteriology* **157**, 591-598.

## L

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.

Lampen, L.O. and Peterson, W.H. (1943) Growth factor requirements of Clostridia. *Archives of Biochemistry* **88**, 3426-3430.

Larson, T.J., Ehrmann, M. and Boos, W. (1983) Periplasmic glycerophosphodiester of *Escherichia coli*, a new enzyme of the glp regulon. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 5428-5432.

Leao, C. and Van Uden, N. (1982) Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* **24**, 2601-2604.

Leao, C. and Van Uden, N. (1984) Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica and Biophysica Acta* **774**, 43-48.

Leaver, F.W., Wood, H.G. and Stjernholm, R. (1955) The fermentation of three carbon substrate by *Clostridium propionicum* and *propionibacterium*. *Journal of Bacteriology* **70**, 521-530.

Lee, H.A. and Abeles, R.H. (1963) Purification and properties of dioldehydrase, an enzyme requiring a cobamide coenzyme. *Journal of Biological Chemistry* **238**, 2367-2373.

Lepage, C., Fayolle, F., Hermann, M. and Vandecasteele, J.P. (1987) Changes in membranes lipid composition of *Clostridium acetobutylicum* during acetone-butanol fermentation: effects of solvents, growth temperature and pH. *Journal of General Microbiology* **133**, 103-110.

Leung, J.C.Y. and Wang, D.I.C. (1981) Production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture using free cells and immobilized cells. Proc. 2<sup>nd</sup> World Congress of Chemical Engineering, Montreal, 1, 348-352.

Lin, E.C.C., Levin, A.P. and Magasanik, B. (1960) The effect of aerobic metabolism on the inducible glycerol dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes*. *Journal of Biological Chemistry* **235**, 1824-1829.

Lin, E.C.C., Koch, J.P., Chused, T.M. and Jorgensen, S.E. (1962) Utilization of L- $\alpha$ -glycerophosphate by *Escherichia coli* without hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **48**, 2145-2150.

Lin, E.C.C. (1976) Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **30**, 535-578.

Lin, E.C.C. and Iuchi, S. (1991) Regulation of gene expression in fermentative and respiratory systems in *Escherichia coli* and related bacteria. *Annual Review of Genetic* **25**, 361-387.

Linden, J.C. and Moreira, A. (1982) Anaerobic production of chemicals. In Hollaender A (ed) "Basis biology of new developments in biotechnology" (basic life science 25). Plenum Press, New York, pp. 377-403.

Lindgren, V. and Rutberg, L. (1974) Glycerol metabolism in *Bacillus subtilis* : gene-enzyme relationships. *Journal of Bacteriology* **119**, 431-442.

Lipmann, F. and Tuttle, L.C. (1945) A specific micro-method for determination of acyl-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* **159**, 21-28.

Liyanage, H., Kashket, S., Young, M. and Kashket, E.R. (2001) *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium difficile* detoxify methylglyoxal by a novel mechanism involving glycerol dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2004-2010.

Lorowitz, W. and Clark, D.P. (1982) *Escherichia coli* mutants with a temperature sensitive alcohol dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* **152**, 935-938.

Loureiro-Dias, M.C. and Peinado, J.M. (1982) Effects of ethanol and other ethanol in yeast. *Biotechnology and Bioengineering* **25**, 2263-2269.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folinphenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.

Luers, F., Seyfried, M., Daniel, R. and Gottschalk, G. (1997) Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters* **154**, 337-345.

## M

Mac Gregor, W.G., Phillips, J. and Suelter, C.H. (1974) Purification and kinetic characterization of a monovalent cation-activated glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes*. *Journal of Biological Chemistry* **249**, 3132-3139.

- Macis, L. Daniel, R. and Gottschalk, G. (1998) Properties and sequence of the coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium pasteurianum*. *FEMS Microbiology Letters* **164**, 21-28.
- Mac Phedran, P., Sommer, B. and Lin, E.C.C. (1961) Control of ethanol dehydrogenase levels in *Aerobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology* **81**, 852-857.
- Macy, J., Kulla, H. and Gottschalk, G. (1976) H<sub>2</sub>-dependent anaerobic growth of *Escherichia coli* on L-malate:succinate formation. *Journal of Bacteriology* **125**, 423-428.
- Maeba, P. and Sanwal, B.D. (1968) The regulation of pyruvate kinase of *Escherichia coli* by fructose diphosphate and adenylic acid. *Journal of Biological Chemistry* **243**, 448-450.
- Magasanik, B., Brooke, M.S. and Karibian, D. (1953) Metabolic pathways of glycerol dissimilation. *Journal of Bacteriology* **66**, 611-619.
- Malaoui, H. and Marczak, R. (2000) Purification and characterization of the 1,3-propanediol dehydrogenase of *Clostridium butyricum* E5. *Enzyme and Microbial Technology* **27** (6), 399-405.
- Marczak, R., Ballongue, J., Petitdemange, H. and Gay, R. (1984) Regulation of the biosynthesis of NADH-rubredoxin oxidoreductase in *Clostridium acetobutylicum*. *Current Microbiology* **10**, 165-168.
- Marczak, R., Ballongue, J., Petitdemange, H. and Gay, R. (1985) Differential levels of ferredoxin and rubredoxin in *Clostridium acetobutylicum*. *Biochimie* **67**, 241-248.
- Marshall, J.H., May, J.W. and Sloan, J. (1985) Purification and properties of glycerol: NAD<sup>+</sup> 2-oxidoreductase (glycerol dehydrogenase) from *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of General Microbiology* **131**, 1581-1588.
- Martin, J.R., Petitdemange, H., Ballongue, J. and Gay, R. (1983) Effects of acetic and butyric acids on solvents production by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Letters* **5**, 89-94.
- May, J.W. and Sloan, J. (1981) Glycerol utilization by *Schizosaccharomyces pombe*: dehydrogenation as the initial step. *Journal of General Microbiology* **123**, 183-185.
- May, J.W., Marshall, J.H. and Sloan, J. (1982) Glycerol utilization by *Schizosaccharomyces pombe*: phosphorylation of dihydroxyacetone by a specific kinase as the second step. *Journal of General Microbiology* **128**, 1763-1766.
- Merck Index (1983) 10<sup>ème</sup> édition. Ed. par Windholz, M. et Budavari, S. Inc. Rahway, N.J., USA.
- Meyer, C.L., and Papoutsakis, E.T. (1989) Increased levels of ATP and NADH are associated with increased solvent production in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**, 450-459.

Meyrial, V. (1996) Bioconversion des glucides majeurs dérivés des lignocelluloses en éthanol. Relation entre les flux de protons traversant la membrane plasmique et la tolérance à l'éthanol de *Pichia stipitis*. Thèse Université Claude Bernard-Lyon I, Lyon, France.

Mickelson, M.N. and Werkman, C.H. (1940) The dissimilation of glycerol by coli-aerogenes intermediate. *Journal of Bacteriology* **39**, 709-715.

Miki, K., Silhavy, T.J. and Andrews, K.J. (1979) Resolution of *glpA* and *glpT* loci into separate operons in *Escherichia coli* K-12 strains. *Journal of Bacteriology* **138**, 268-269.

Millar, D.G., Griffiths-Smith, K., Algar, E. and Scopes, K.K. (1982) Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnology Letters* **4**, 601-606.

Mindich, L. (1968) Pathway from oxidative dissimilation of glycerol in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **96**, 565-566.

Mitchell, P. and Moyle, J. (1959) *Journal of General Microbiology* **20**, 434-439.

Mitchell, W.J. (1998) Physiology of carbohydrates to solvent conversion by Clostridia. *Advances in Microbial Physiology* **39**, 31-130.

Mitchel-Savin, D., Marchal, R. and Vandecasteele, J.P. (1990) Butyrate production in continuous culture of *Clostridium tyrobutyricum*, effect of end-product inhibition. *Applied Microbiology and Biotechnology* **33**, 127-131.

Mortenson, L.E., Valentine, R.C., and Carnahan, J.E. (1962) An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **7**, 448-452.

Mortenson, L.E., Valentine, R.C., and Carnahan, J.E. (1963) Ferredoxin in the phosphoroclastic reaction of pyruvic acid and its relation to nitrogen fixation in *Clostridium pasteurianum*. *Journal of Biological Chemistry* **238**, 794-800.

Mortlock, R.P., Valentine, R.C., and Wolfe, R.S. (1959) Carbon dioxide activation in the pyruvate clastic system of *Clostridium butyricum*. *Journal of Biological Chemistry* **234**, 1653-1656.

Moulis, J.M. and Meyer, J. (1982) Characterization of the selenium-substituted 2 (4Fe-4Se) ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* **21**, 4762-4771.

## N

Nagodawithana, T.W., Whitt, J.T. and Cutaia, A.J. (1977) Study of the feedback effect of ethanol on selected enzymes of the glycolytic pathway. *ASBC J* **35**, 179-183.

Nanninga, H.J. and Gottschal, J.C. (1987) Properties of *Desulfovibrio carbinolicus* sp nov and other sulfate reducing bacteria isolated from anaerobic-purification plant. *Applied and Environmental Microbiology* **51**, 572-579.

Neijssel, O.M. and Tempest, D.W. (1975) The regulation of carbohydrate metabolism in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 organisms, growing in chemostat culture. *Archives of Microbiology* **106**, 251-258.

Neijssel, O.M., Huetting, S., Crabbendam, K.J. and Tempest, D.W. (1975) Dual pathways of glycerol assimilation in *Klebsiella aerogenes* NCIB 418. Their regulation and possible function significance. *Archives of Microbiology* **104**, 83-87.

Nicaud, C. (1980) Nomenclature des produits chimiques. Dans: "guide de la chimie internationale". Ed. by Imprimerie Nouvelles, Yvelot, France.

## O

Ogbe Solomon, B., Zeng, A.P., Biebl, H. Okechukwu Ejiofor, A., Posten, C. and Deckwer, W.D. (1994) Effects of substrate limitation on product distribution and H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ratio in *Klebsiella pneumoniae* during anaerobic fermentation of glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **42**, 222-226.

Oh, Y.K., Freese, E.B. and Freese, E. (1973) Abnormal septation and inhibition of sporulation by accumulation of L- $\alpha$ -glycerophosphate in *Bacillus subtilis* mutants. *Journal of Bacteriology* **113**, 1034-1045.

Ollivier, B., Cord-Ruwisch, R., Lombardo, A. and Garcia, J.L. (1985) Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp nov, a methylotrophic homoacetogenic bacterium. *Archives of Microbiology* **142**, 307-310.

Ollivier, B., Cord-Ruwisch, R., Matchikian, E.C. and Garcia, J.L. (1988) Characterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp nov. *Archives of Microbiology* **149**, 447-450.

Otsuka, H. and Együd, L.G. (1968) Locus of the inhibition of protein synthesis by aldoketones. *Current of Molecular Biology* **2**, 106-110.

## P

Pascual, C., Alonso, A., Garcia, I. and Romay, C. (1988) Effect on ethanol on glucose transport, key glycolysis enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* **32**, 374-378.

Pawelkiewicz, J. and Zagalak, B. (1965) Enzymic conversion of glycerol into  $\beta$ -hydroxypropionaldehyde in a cell-free extract from *Aerobacter aerogenes*. *Acta Biochimica Polonica* **12**, 207-218.

Petitdemange, E., Dürr, C., Abbad-Andaloussi, S., and Raval, G. (1995) Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *Journal of Industrial Microbiology* **15**, 498-502.

Petitdemange, H. (1976) Etude de l'oxydoréduction des nucléotides pyridiniques par les enzymes à ferrédoxine chez les Clostridia du groupe des butyriques. Thèse Doctorat, Université de Nancy I.



Petitdemange, H., Cherrier, C., Raval, G. and Gay, R. (1976) Regulation of the NADH-fd oxidoreductases in Clostridia of butyric group. *Biochimica and Biophysica Acta* **421**, 334-347.

Pike, L. and Sojka, G.A. (1975) Glycerol dissimilation in *Rhodopseudomonas sphaeroïdes*. *Journal of Bacteriology* **124**, 1101-1105.

Poznanskaya, A.A., Yakusheva, M.I. and Yarovlev, V.A. (1977) Study on the mechanism of action of adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase from *Aerobacter aerogenes*. II. The inactivation kinetics of glycerol dehydratase complexes with adenosylcobalamin and its analogs. *Biochimica and Biophysica Acta* **384**, 236-243.

Poznanskaya, A.A. and Korsova, T.L. (1979) Adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase interaction with substrates and their analogs. Ed. Walter de Gruyter & Co., Berlin New York, USA.

## Q

Qatibi, A.I. and Bories, A. (1988) Glycerol fermentation and sulfate utilization during the anaerobic digestion process. In: " Fifth International Symposium of Anaerobic Digestion". Ed. by Monduzzi, Bologna, pp. 69-73.

Qatibi, A.I., Bories, A. and Garcia, J.L. (1991) Sulfate reduction and anaerobic glycerol degradation by a mixed microbial culture. *Current Microbiology* **22**, 47-52.

## R

Racker, E. (1951) The mechanism of action of glyoxalase. *Journal of Biological Chemistry* **190**, 685-96.

Reed, L.J. (1974) Multienzyme complexes. *Accounts of Chemical Research* **7**, 40-46

Reimann, A. and Biebl, H. (1996) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* DSM 5431 and product tolerant mutants in fedbatch culture : feeding strategy for glycerol and ammonium. *Biotechnology Letters* **18**, 827-832.

Rickey, D.P. and Lin, E.C.C. (1972) Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **112**, 784-790.

Rose, I.A., Grunberg-Manago, M., Korey, S.R. and Ochoa, S. (1954) Enzymatic phosphorylation of acetate. *Journal of Biological Chemistry* **211**, 737-756.

Ruch, F.E., Lengeler, J., and Lin, E.C.C. (1974) Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology* **119**, 50-56.

Ruch, F.E. and Lin, E.C.C. (1975) Independent constitutive expression of the aerobic and anaerobic pathways of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology* **124**, 348-352.

Ruch, F.E., Lin, E.C.C., Kowitt, J.D., Tang, C.T. and Goldberg, A.L. (1980) In vivo inactivation of glycerol dehydrogenase in *Klebsiella aerogenes*: properties of active and inactivated proteins. *Journal of Bacteriology* **141**, 1077-1085.

Rush, D., Karibian, D., Karnovski, M.L. and Magasanik, B. (1957) Pathway of glycerol dissimilation in two strains of *Aerobacter aerogenes*: enzymatic and tracer studies. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 891-899.

## S

Saheb, S.A. (1972a) Perméation du glycérol et sporulation chez *Bacillus subtilis*. *Canadian Journal of Microbiology* **18**, 1307-1313.

Saheb, S.A. (1972b) Study of metabolism of glycerol by two mutants of *Bacillus subtilis*. *Canadian Journal of Microbiology* **18**, 1315-1325.

Saint-Amans, S. (1994) Etude physiologique de la production de 1,3-propanediol chez *Clostridium butyricum*. Thèse INSA, Toulouse, France.

Saint-Amans, S. and Soucaille, P. (1995) Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glucose-glycerol mixture. *Biotechnology Letters* **17**, 211-216.

Saint-Amans, S., Perlot, P., Goma, G., and Soucaille, P. (1994) High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. *Biotechnology Letters* **16**, 831-836.

Saint-Amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K. and Soucaille, P. (2001) Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. *Journal of Bacteriology* **183**, 1748-1754.

Saint Martin, E.J., Freedberg, W.B. and Lin, E.C.C. (1977) Kinase replacement by a dehydrogenase for *Escherichia coli* glycerol utilization. *Journal of Bacteriology* **131**, 1026-1028.

Sanno, Y., Wilson, T.H. and Lin, E.C.C. (1968) Control of permeation to glycerol in cells of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Com* **32**, 344-349.

Sanwal, B.D. (1970) Allosteric control of amphibolic pathway in bacteria. *Bacteriological Reviews* **34**, 20-39.

Sauvageot, N., Gouffi, K., Laplace, J.M. and Auffray, Y. (2000) Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 167-70.

Sawers, G. and Böck, A. (1988) Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **170**, 5330-5336.

Scharschmidt, M., Pfleiderer, G., Metz, H. and Brummer, W. (1983) Isolation and characterization of glycerol dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Hoppe Seylers Z Physiological Chemistry* **364** (7), 911-921.

- Schatz, G. (1967) Stable phosphorylating submitochondrial particules from baker's yeast. *Methods in Enzymology* **10**, 197-202.
- Schaupp, A. and Ljungdahl, L.G. (1974) Purification and properties of acetate kinase from *Clostridium thermoaceticum*. *Archives of Microbiology* **100**, 121-129.
- Schink, B. and Stieb, M. (1983) Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, non-sporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp.nov. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 1905-1913.
- Schneider, Z. and Pawelkiewicz, J. (1966) The properties of glycerol dehydratase isolated from *Aerobacter aerogenes* and the properties of the apoenzyme subunits. *Acta Biochimica Polonica* **13**, 311-328.
- Schneider, Z., Larsen, E.G., Jacobson, G., Johnson, B.C. and Pawelkiewicz, J. (1970) Purification and properties of glycerol dehydratase. *Journal of Biological Chemistry* **245**, 3388-3396.
- Schütz, H. and Radler, F. (1984) Anaerobic reduction of glycerol to 1,3-propanediol by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Systematic and Applied Microbiology* **5**, 169-178.
- Schwartz, E.R., Old, L.O. and Reed, L.J. (1968) Regulatory properties of pyruvate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **31**, 495-500.
- Serjak, W.C., Day, W.H., Van Lanen, J.M. and Boruff, C.S. (1954) Acrolein production by bacteria found in distillery grain mashes. *Applied of Microbiology* **2**, 14-20.
- Seyfried, M., Daniel, R. and Gottschalk, G. (1996) Cloning sequencing and overexpression of the genes encoding coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *Journal of Bacteriology* **178**, 5793-5796.
- Shaw, D.J., Rice, D.W. and Guest, J.R. (1983) Homology between CAP and Fnr, a regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **166**, 241-247.
- Skraly, F.A., Lytle, B.L. and Cameron, D.C. (1998) Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 98-105.
- Slininger, P.J., Bothast, R.J. and Smiley, K.L. (1983) Production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 62-67.
- Slininger, P.J. and Bothast, R.J. (1985) Optimizing aerobic conversion of glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 62-67.
- Snoep, J.L., Teixeira de Mattos, M.J., Postma, P.W. and Neijssel, O.M. (1990) Involvement of pyruvate dehydrogenase in product formation in pyruvate-limited anaerobic chemostat cultures of *Enterococcus faecalis* NCTC 775. *Archives of Microbiology* **154**, 50-55.

Snoep, J.L., Westphal, A.H., Benen, J.A.E., Teixeira de Mattos, M.J., Neijssel, O.M. and De Kok, A. (1992) Isolation and characterization of the pyruvate dehydrogenase complex of anaerobically grown *Enterococcus faecalis* NCTC 775. *European Journal of Biochemistry* **203**, 245-250.

Sobolov, M. and Smiley, K.L. (1960) Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *Lactobacillus*. *Journal of Bacteriology* **79**, 261-266.

Spencer, P., Bown, K.J., Scawen, M.D., Atkinson, T. and Gore, M.G. (1989) Isolation and characterization of the glycerol dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochimica and Biophysica Acta* **994** (3), 270-279.

Spiro, S. and Guest, J.R. (1987) Activation of the lac operon of *Escherichia coli* by a mutant FNR protein. *Molecular Microbiology* **1**, 53-58.

Sprague, G.F. and Cronan, J.E. (1977) Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in glycerol catabolism. *Journal of Bacteriology* **129**, 1335-1342.

Sprenger, G.A., Hammer, B.A., Johnson, E.A. and Lin, E.C.C. (1989) Anaerobic growth of *Escherichia coli* on glycerol by importing genes of the *dha* regulon from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of General Microbiology* **135**, 1255-1262.

Stanley, G.A., Douglas, N.G., Every, E.J., Tzanatos, T. and Pamment, N.B. (1993) Inhibition and stimulation of yeast growth by acetaldehyde. *Biotechnology Letters* **15**, 1199-1204.

Stieb, M. and Schink, B. (1984) A new 3-hydroxybutyrate fermenting anaerobe, *Ilyobacter polytropus*, gen.nov.sp.nov., possessing various fermentation pathways. *Archives of Microbiology* **140**, 139-146.

Streetsktra, H., Teixeira, de Mattos, M.J., Neijssel, O.M. and Tempest, D.W. (1987) Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture. *Archives of Microbiology* **147**, 268-275.

Strickland, J.E. and Miller, O.N. (1968) Inhibition of glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by dihydroxyacetone, high ionic strength, and monovalent cations. *Biochimica and Biophysica Acta* **159**, 221-226.

Stroinski, A., Pawelkiewicz, J. and Johnson, B.C. (1974) Allosteric interactions in glycerol dehydratase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **162**, 321-330.

## T

Takahashi, S., Abbe, K. and Yamada, T. (1982) Purification of pyruvate formate-lyase from *Streptococcus mutans* and its regulatory properties. *Journal of Bacteriology* **149**, 1034-1040.

Talarico, T.L., Casas, I.A., Chung, T.C. and Dobrogosz, W.J. (1988) Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents of Chemotherapy* **32**, 1854-1858.

- Talarico, T.L. and Dobrogosz, W.J. (1989) Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents of Chemotherapy* **33**, 674-679.
- Talarico, T.L. and Dobrogosz, W.J. (1990) Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 1195-1197.
- Talarico, T.L., Axelsson, L.T., Novotny, L., Fiuzat, M. and Dobrogosz, W.J. (1990) Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri* : purification of 1,3-propanediol : NAD<sup>+</sup> oxidoreductase. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 943-948.
- Tang, C.T., Ruch, F.E., JR. and Lin, E.C.C. (1979) Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase that serves an *Escherichia coli* mutant for glycerol catabolism. *Journal of Bacteriology* **140**, 182-187.
- Tang, I.C., Okos, M.R. and Yang, S.T. (1989) Effect of pH and acetic acid on homoacetic fermentation of lactate by *Clostridium formicoaceticum*. *Biotechnology and Bioengineering* **34**, 1063-1074.
- Tarmy, E.M. and Kaplan, N.O. (1965) Interacting binding sites of L-specific lactic dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **21**, 379-383.
- Tarmy, E.M. and Kaplan, N.O. (1968) Kinetics of *Escherichia coli* B D-lactate dehydrogenase and evidence of pyruvate-controlled change in conformation. *Journal of Biological Chemistry* **243**, 2587-2596.
- Teixeira, de Mattos, M.J. and Tempest, D.W. (1983) Metabolite and energetic aspect of the growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glucose in anaerobic chemostat culture. *Archives of Microbiology* **134**, 80-85.
- Teixeira, de Mattos, M.J., Streekstra, H. and Tempest, D.W. (1984) Metabolic uncoupling of substrate level phosphorylation in anaerobic glucose-limited chemostat cultures of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418. *Archives of Microbiology* **139**, 260-264.
- Thauer, R.K., Kirchniawy, F.H. and Jungermann, K.A. (1972) Properties and function of the pyruvate formate-lyase reaction in *Clostridia*. *European Journal of Biochemistry* **27**, 282-290.
- Thauer, R.K., Jungermann, K.A. and Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* **41**, 100-180.
- Thorner, J.W. and Paulus, H. (1973) Catalytic and allosteric properties of glycerol kinase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **248**, 3922-3932.
- Tong, I.T., Liao, H.H., and Cameron, D.C. (1991) 1,3-propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from *Klebsiella pneumoniae* dha regulon. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3541-3546.

Tong, T. and Cameron, D.C. (1992) Enhancement of 1,3-propanediol production by cofermentation in *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* dha regulon genes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **34/35**, 149-159.

Toraya, T., Shirakashi, T., Kosuga, T., and Fukui, S. (1976) Substrate specificity of coenzyme B12-dependent diol dehydrase : glycerol as both a good substrate and a potent inactivator. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **69**, 475-480.

Toraya, T. and Fukui, S. (1977) Immunochemical evidence for the difference between coenzyme B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. *European Journal of Biochemistry* **76**, 285-289.

Toraya T, Ushio K, Fukui S, Hogenkamp HPC (1977) Studies on the mechanism of the adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction by use of analogs of the coenzyme. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 963-970.

Toraya, T., Honda, S., Kuno, S. and Fukui, S. (1978) Coenzyme B12-dependent diol dehydratase : regulation of apoenzyme synthesis in *Klebsiella pneumoniae* (*Aerobacter aerogenes*) ATCC 8724. *Journal of Bacteriology* **135**, 726-729.

Toraya, T., Honda, S. and Fukui, S. (1979) Fermentation of 1,2-propanediol and 1,2-ethanediol by some genera of *Enterobacteriaceae*, involving coenzyme B12-dependent diol dehydratase. *Journal of Bacteriology* **139**, 39-47.

Toraya, T., Kuno, S. and Fukui, S. (1980) Distribution of coenzyme B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae*. *Journal of Bacteriology* **141**, 1439-1442.

Tran-Dinh, K. and Hill, F.F. (1989) Verfahren zur Herstellung von Propanediol (1,3). Brevet Allemand n° DE 37 34 764 A1.

Tsay, S.S., Brown, K.K., and Gaudy, E.T. (1971) Transport of glycerol by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **108**, 82-88.

Tubbs, P.K. and Garland, P.B. (1969) Assays of coenzyme A and some acyl derivatives. In *Methods of enzymology*, vol **XIII**, pp. 535-551. Edited by Lowenstein J.M. New York and London, Academic press.

Twarog, R. and Wolfe, R.S. (1962) Enzymatique phosphorylation of butyrate. *Journal of Biological Chemistry* **237**, 2474-2477.

## V

Valentine, R.C. and Wolfe, R.S. (1960) Purification and role of phosphotransbutyrylase. *Journal of Biological Chemistry* **235**, 1948-1952.

Vancauwenberge, J.E., Slininger, P.J. and Bothast, R.J. (1990) Bacterial conversion of glycerol to  $\beta$ -hydroxypropionaldehyde. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 329-332.

Vasconcelos, I., Girbal, L. and Soucaille, P. (1994) Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixture of glucose and glycerol. *Journal of Bacteriology* **176**, 1443-1450.

Veiga-Da-Cunha, M. and Foster, M.A. (1992) 1,3-propanediol : NAD<sup>+</sup> oxidoreductase of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2005-2010.

Voisenet, E. (1910) Formation d'acroléine dans la maladie de l'amertume des vins. *Comptes rendus de l'académie des Sciences*. **150**, 1614-1616.

Vries, W. and Stouthamer, A.H. (1968) Fermentation of glucose, galactose, mannitol and xylose by *Bifidobacteria*. *Journal of Bacteriology* **96**, 472-478.

## W

Wagner, A.F.V., Frey, M., Neugebauer, F.A., Schäfer, W. and Knappe, J. (1992) *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **89**, 996-1000.

Wassef, M.K., Sarner, J. and Kates, M. (1970) Stereospecificity of the glycerol kinase and glycerophosphate dehydrogenase in *Halobacterium cutirubrum*. *Can J Biochem* **48**, 69-73.

Weissenborn, D.L., Wittekindt, N. and Larson, T.J. (1992) Structure and regulation of the glpFK operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 6122-6131.

Wiame, J.M., Bourgeois, S. and Lambion, R. (1954) L'oxydation du glycérol étudiée à l'aide de variants de *Bacillus subtilis*. *Nature* **174**, 37-38.

Wieker, H.J. and Hess, B. (1971) Allosteric interactions of yeast pyruvate kinase as function of pH. *Biochemistry* **10**, 1243-1248.

Wiesenborn, D.P., Rudolph, F.B. and Papoutsakis, E.T. (1989) Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in acidogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 317-322.

Williams, S.G., Greenwood, J.A. and Jones, C.W. (1994) The effect of nutrient limitation on glycerol uptake and metabolism in continuous cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **140**, 2961-2969.

Wimpenny, J.W.T. and Firth, A. (1972) Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *Journal of Bacteriology* **111**, 24-32.

Winder, F.G. and O' Hara, C. (1964) Effects of iron deficiency and of zinc deficiency on the activities of some enzymes in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemical Journal* **90**, 122-126.

Winder, F.G. and Brennan, P.J. (1966) Initial steps in the metabolism of glycerol by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* **92**, 1846-1847.

Witt, U., Müller, R.J., Augusta, J., Widdecke, H. and Deckwer, W.D. (1994) Synthesis, properties and biodegradability of polyesters based on 1,3-propanediol. *Macromolecular Chemistry and Physics* **195**, 793-902.

Wittenberger, C.L. and Angelo, N. (1970) Purification and properties of a fructose-1,6-diphosphate-activated lactate dehydrogenase from *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* **101**, 717-724.

Wolin, M.J. (1964) Fructose-1,6-diphosphate requirement of streptococcal lactic dehydrogenases. *Science* **146**, 775-776.

Woods, D.R. (1993) The clostridia and biotechnology. In: Woods, D.R. (ed) *Biotechnology*, vol **25**, Stoneham, M.A., Butterworth-Heinemann, pp. 1-429.

## Y

Yamada, T. and Carlsson, J. (1975) Regulation of lactate dehydrogenase and change of fermentation products in *Streptococci*. *Journal of Bacteriology* **124**, 55-61.

## Z

Zeng, A.P., Biebl, H. and Deckwer, W.D. (1990) Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **33**, 485-489.

Zeng, A.P. and Deckwer, W.D. (1991) A model for multiproduct-inhibited growth of *Enterobacter aerogenes* in 2,3-butanediol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **35**, 1-3.

Zeng, A.P., Biebl, H., Schlieker, H. and Deckwer, W.D. (1993) Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: regulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme and Microbial Technology* **15**, 770-779.

Zeng, A.P., Ross, A., Biebl, H., Tag, C., Günzel, B. and Deckwer, W.D. (1994) Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* **44**, 902-911.

Zinoni, F., Beier, A., Pecher, A., Wirth, R. and Böck, A. (1984) Regulation of the synthesis of hydrogenase (formate hydrogen-lyase linked) of *E. coli*. *Archives of Microbiology* **139**, 299-304.

Zwaig, N. and Lin, E.C.C. (1966) Feedback inhibition of glycerol kinase, a catabolic enzyme in *Escherichia coli*. *Science* **153**, 755.

Zwaig, N., Kistler, W.S. and Lin, E.C.C. (1970) Glycerol kinase: the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **102**, 753-759.

Zwaig, N. and Dieguez, E. (1970) Bactericidal product obtained from a mutant of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **40**, 1415-1422.





## RESUME

*Clostridium butyricum* est une bactérie anaérobie stricte, capable de fermenter le glycérol en formant majoritairement du 1,3-propanediol (1,3-PPD). Nous avons recherché à optimiser les conditions de production du 1,3-PPD, un composé à haute valeur ajoutée. Cette voie biotechnologique peut être amenée à concurrencer les filières industrielles plus classiques.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que la souche de la collection DSM 5431 freinait sa production de 1,3-PPD en raison de l'activité limitante d'une glycérol déshydratase due à la formation d'un intermédiaire toxique, le 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA). L'ajout d'un co-substrat comme le glycéraldéhyde réduit par la 1,3-propanediol déshydrogénase évite l'accumulation de NADH intracellulaire responsable de l'utilisation limitée du glycérol. Cet ajout favorise ainsi le développement cellulaire par une augmentation de l'utilisation de glycérol mais sans modifier le rendement en 1,3-PPD.

Nous avons déduit de ce premier résultat que l'amélioration des performances fermentaires de *Clostridium butyricum* passait par l'étude de nouvelles souches (E5) isolées au laboratoire. Celles ci ont comme premier avantage d'utiliser le glycérol avec des productivités plus élevées. Afin d'améliorer le rendement en 1,3-PPD nous avons mené des expériences en continu de cofermentation sur des mélanges glucose-glycérol. L'ajout de glucose permet d'augmenter ce rendement de 0,6 à 0,9 environ selon un rapport molaire glucose/glycérol différent suivant la souche étudiée. Il a été montré que cette amélioration est due principalement au fait que l'ajout graduel de glucose équilibre progressivement les deux voies en compétition pour l'utilisation des équivalents réducteurs. Les différences observées entre une souche sauvage WT et une souche mutante MD résistante à l'alcool allylique peuvent être attribuées à une moindre sensibilité de cette dernière à la répression catabolique par le glucose.

Afin de compléter les études physiologiques, nous avons purifié chez la souche sauvage les deux activités majeures et non limitantes responsables du devenir métabolique du glycérol : la 1,3-propanediol déshydrogénase et la glycérol déshydrogénase. La première enzyme a pu être purifiée jusqu'à homogénéité et sa séquence N terminale a été établie. Il en résulte que cette protéine présente une grande homologie avec des enzymes ayant la même fonction chez d'autres bactéries ainsi que les mêmes caractéristiques structurales. La glycérol déshydrogénase n'a pu être purifiée que partiellement.

Afin de mieux cerner les propriétés cinétiques des deux activités enzymatiques étudiées dans le cadre de ce travail, nous avons mis à profit les résultats précédents pour établir un protocole de séparation rapide de ces deux activités sensible à la présence d'oxygène. Il a permis de mieux caractériser chacune de ces activités pour les deux souches étudiées (sauvage et mutant) et d'expliquer en particulier l'effet toxique du 3-HPA par une grande affinité de ce composé pour les déshydrogénases.

En conclusion, *Clostridium butyricum* E5 apparaît comme un excellent micro-organisme pouvant servir d'outil biotechnologique pour l'optimisation de la production de 1,3-PPD quelle que soit la source carbonée. La condition principale est de mettre à profit les dernières connaissances du génie génétique qui ont déjà permis d'élaborer un schéma métabolique permettant de produire directement, à partir d'une source carbonée facilement disponible, du 1,3-propanediol par un unique micro-organisme génétiquement modifié.

**MOTS CLES :** *Clostridium butyricum*, glycérol, 1,3-propanediol, glycéraldéhyde, glucose, 3-hydroxypropionaldéhyde, 1,3-propanediol déshydrogénase, glycérol déshydrogénase.