



HAL
open science

Etude du flux carboné chez *Clostridium butyricum*

Samir Abbad Andaloussi

► **To cite this version:**

Samir Abbad Andaloussi. Etude du flux carboné chez *Clostridium butyricum*. Chimie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1996. Français. NNT : 1996NAN10276 . tel-01747968

HAL Id: tel-01747968

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747968v1>

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

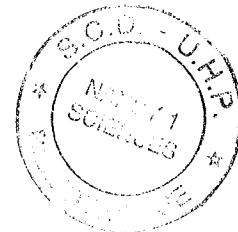
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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



FACULTÉ DES SCIENCES

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



THÈSE

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en

**BIOLOGIE STRUCTURALE, MOLECULAIRE
ET CELLULAIRE**

par

Samir ABBAD ANDALOUSSI

SUJET :

**ÉTUDE DU FLUX CARBONÉ CHEZ *CLOSTRIDIUM
BUTYRICUM***

Soutenue publiquement le 20 Décembre 1996 à 14 h devant la commission d'examen :

Membres du jury

Président :	M. G. BRANLANT	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
Rapporteurs :	M. J.P. VANDECASTEELE	Chef de Projet à l'Institut Français du Pétrole
	M. M. FICK	Professeur CNRS, ENSAIA-INPL, Nancy
Examineur :	Mme C. FINANCE	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
	M. H. PETITDEMANGE	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy-I
		Directeur de recherche

A mes Parents
pour NAWAL

REMERCIEMENTS

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

Monsieur le Professeur H. Petitdemange pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Chimie Biologique I et 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 : Monsieur J.P. Vandecasteele, Chef de Projet à l'Institut Français du Pétrole, Monsieur M. Fick, Professeur CNRS à ENSAIA de Nancy, Madame C. Finance, Professeur à l'Université Henri Poincaré-Nancy 1 et Monsieur G. Branlant, Professeur à l'Université Henri Poincaré-Nancy 1.

Ma reconnaissance s'adresse tout particulièrement à Madame E. Petitdemange, Monsieur J. Amine, Monsieur G. Raval, C. Manginot-Dürr, P. Gerard, H. Malaoui pour leur contribution à ce travail et pour leur sympathie.

Je remercie également chacun de mes collègues de laboratoire pour leur conseil, leur amitié et leur bonne humeur.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS.....	1
Chapitre 1. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I. Le glycérol.....	3
I.1. Origine et gisement.....	3
I.2. Utilisation du glycérol.....	5
II. Métabolisme du glycérol.....	5
II.1. Généralités.....	5
II.2. Catabolisme du glycérol.....	5
II.2.1. Bactéries aérobies.....	6
II.2.2. Bactéries anaérobies facultatives.....	7
II.2.3. Bactéries anaérobies strictes.....	21
III. Métabolisme des sucres et du glycérol par <i>Clostridium butyricum</i>.....	22
III.1. Caractéristiques du micro-organisme.....	22
III.1.1. Micro-organisme	22
III.1.2. Conditions de culture.....	22
III.2. Les voies métaboliques	25
III.2.1. Réaction phosphoroclastique.....	25
III.2.2. Flux métabolique du carbone vers les produits.....	26
III.2.2.1. Voie de formation du 1,3-propanediol	26
III.2.2.2. Voies de production des acides et de l'éthanol.....	27
III.2.3. Flux métabolique d'électrons.....	28
III.3. Métabolites inhibiteurs.....	31
III.3.1. Les acides acétique et butyrique.....	31
III.3.2. Les alcools.....	32
IV. Propriétés et régulations des enzymes impliquées dans la synthèse des produits de fermentation chez les <i>clostridia</i>.....	34
IV.1. Le système de distribution d'électrons.....	34
IV.1.1. Activités hydrogénasiques.....	34
IV.1.2. Activités NADH et NADPH-ferrédoxine oxydoréductasiques.....	35
IV.2. Activités des enzymes impliquées dans le métabolisme intermédiaire.....	38
IV.2.1. La pyruvate déshydrogénase.....	38

IV.2.2.Activités enzymatiques impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA en butyryl-CoA.....	39
IV.3.La formation des acides. (Les phosphotransacylases et les kinases).....	40
V.1,3-Propanediol	43
VI.Approche du travail.....	45
Chapitre 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	46
I.Souches utilisées.....	46
II.Milieux de culture.....	46
II.1.Milieux de culture.....	46
II.2.Milieu utilisé en cultures discontinues à pH régulé.....	48
II.3.Milieu utilisé en cultures continues.....	48
III.Conditions de Culture.....	48
III.1.Cultures en tubes.....	48
III.2.Cultures en fermenteurs.....	49
III.2.1.Cultures discontinues.....	49
III.2.2.Cultures continues.....	49
IV.Méthodes analytiques.....	49
IV.1.Détermination de la concentration cellulaire.....	49
IV.1.1.Méthode spectrophotométrique.....	49
IV.1.2.Matière sèche.....	50
IV.2.Dosage des Substrats.....	50
IV.2.1.Glucose.....	50
IV.2.2.Glycérol.....	50
IV.2.3.Glycéraldéhyde.....	50
IV.3.Dosage des produits de fermentation.....	51
IV.4.Détermination des concentrations intracellulaires en nucléotides.....	51
IV.4.1.Dosage du NAD ⁺ intracellulaire.....	51
IV.4.1.1.Extraction.....	51
IV.4.1.2.Dosage du NAD ⁺ par fluorimétrie.....	51
IV.4.2.Dosage du NADH intracellulaire.....	52
IV.4.2.1.Extraction.....	52
IV.4.2.2.Dosage du NADH par fluorimétrie.....	52

IV.4.3. Dosage de l'acétyl-CoA.....	53
IV.4.3.1 Extraction.....	53
IV.4.3.2. Dosage de l'acétyl-coenzyme A par photométrie.....	53
IV.5. Évaluation des activités enzymatiques.....	53
IV.5.1. Préparation des extraits acellulaires.....	53
IV.5.2. Dosage des protéines.....	54
IV.5.3. Détermination des activités enzymatiques.....	54
V. Isolement de nouvelles souches de <i>Clostridium butyricum</i>	
aptés à fermenter le glycérol.....	57
V.1. Isolement	57
V.2. Tests effectués sur ces souches.....	57
VI. Mutagenèse et sélection des mutants.....	57
VI.1. Mutagenèse en milieu liquide.....	57
VI.2. Sélection des mutants résistants aux produits et substrats.....	58
VI.3. Sélection des mutants résistants à l'alcool allylique.....	58
Chapitre 3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	60
Partie 1. Isolement de nouvelles souches.....	60
I. Recherche et étude de nouvelles souches de <i>Clostridium butyricum</i> aptés à fermenter le glycérol issu d'une unité de production de "biocarburant".....	60
I. 1. Introduction.....	60
I. 2. Résultats.....	61
I.3. Conclusion.....	67
Partie 2. Caractérisation de la fermentation du glycérol par <i>C. butyricum</i>	68
II. Étude du flux carboné chez <i>Clostridium butyricum</i> cultivée en culture continue sur glycérol et sur glucose.....	68
II.1. Introduction	68
II.2. Résultats	68
II.3. Conclusion.....	98
Partie 3. Isolement des mutants de <i>C. butyricum</i>.....	99
III. Recherche des mutants de <i>C. butyricum</i> résistants à de fortes concentrations de 1,3-propanediol et de glycérol.....	99
III.1. Introduction.....	99
III.2. Résultats.....	100

III.3.Conclusion.....	122
IV.Recherche de mutants de <i>C. butyricum</i> résistants à l'alcool allylique.....	123
IV.1.Introduction.....	123
IV.2.Résultats.....	124
IV.3.Conclusion.....	147
Partie 4.Détermination des étapes limitantes de la fermentation du glycérol par <i>C. butyricum</i>.....	148
V.Effet d'un co-substrat (aldéhyde) sur la fermentation du glycérol par <i>Clostridium butyricum</i>	148
V.1.Introduction.....	148
V.2.Résultats.....	148
V.3.Conclusion.....	169
Chapitre 5.CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	170
BIBLIOGRAPHIE.....	176

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Jusqu'à présent, le glycérol (production annuelle mondiale de 450 000 tonnes/an) était essentiellement obtenu par voie pétrochimique, à partir du propylène et comme composé secondaire de l'industrie oléochimique.

Actuellement, son marché est susceptible de connaître un nouvel essor du fait du développement de filières de valorisation des matières premières agricoles par la production de bio-carburants : l'éthanol, formé à partir des glucides simples et des polymères osidiques des végétaux ainsi que des esters, issus de l'estérification des triglycérides des matières grasses (diester produit à partir de l'huile de colza). Le glycérol en effet est le co-produit majeur de la fabrication de ces produits énergétiques d'origine végétale.

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

Vis-à-vis de 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, d'où une gamme étendue de produits de conversion :

- la dihydroxyacétone (DHA) formée au cours du métabolisme oxydatif du glycérol par les bactéries acétiques et *Cellulomonas* sp.

Cette molécule est déjà actuellement produite par voie biologique et est essentiellement utilisée en cosmétologie. La DHA est un produit à haute valeur ajoutée. Cependant, le marché présente actuellement l'inconvénient d'être limité, mais des perspectives de développement peuvent être offertes grâce à son utilisation en synthèse chimique.

- le 1,3-propanediol 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 en effet, un composé présentant un degré de réduction élevé, dont la conversion en pyruvate (catabolisme du glycérol 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. Cela constitue un modèle d'étude des problèmes inhérents au problème d'équilibre d'oxydoréduction cellulaire, et notamment à la régulation du métabolisme par le pool intracellulaire en 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 et cinétiques 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 exemple le fumarate) ou une voie métabolique consommatrice d'équivalents réducteurs en conditions anaérobies.

ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE GLYCÉROL

Le glycérol (propane-1,2,3-triol), composé organique de formule $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$, 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 poids 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, mélanges 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 bio-éthanol, en tant que co-métabolite de la fermentation alcoolique des sucres 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. 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 :

* la synthèse pétrochimique, couvrant 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**).

propylène -----> chlorure d'allyle -----> épichorydrine -----> glycérol

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

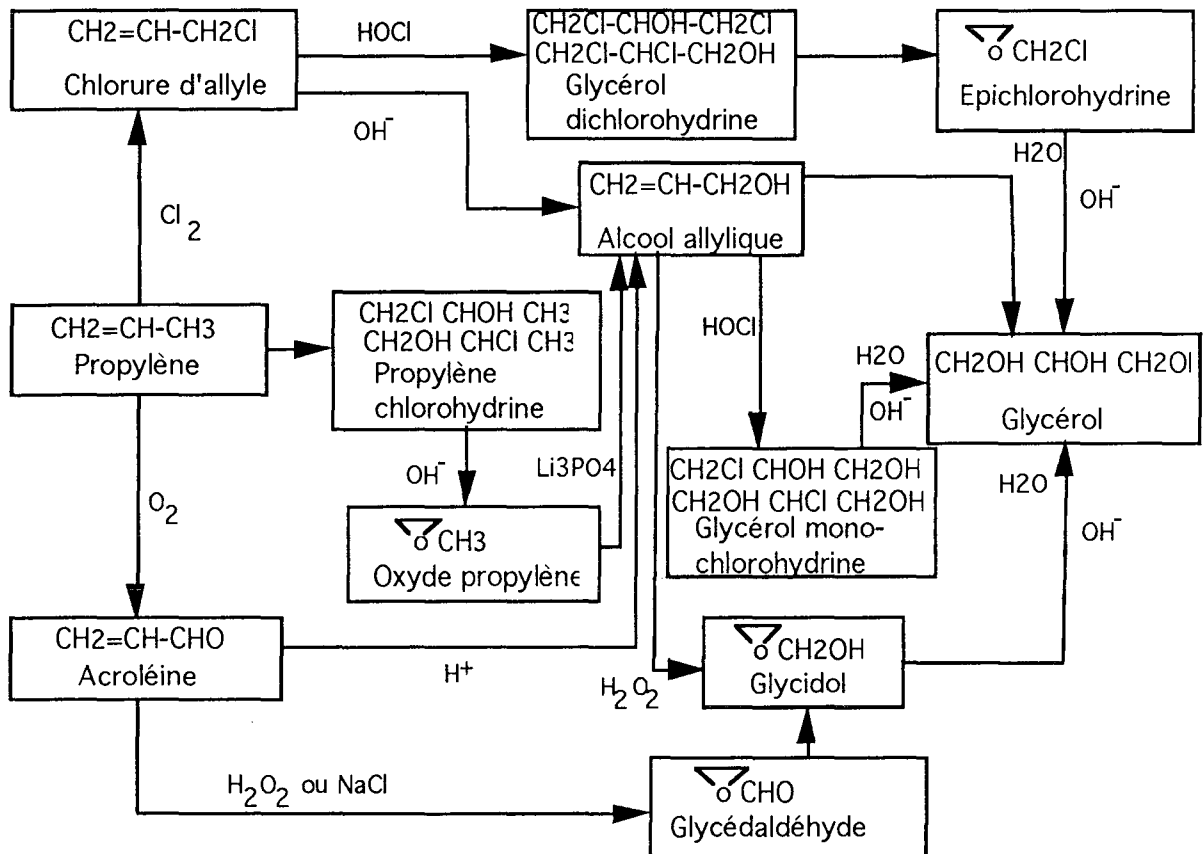


Figure 1. Production du glycérol par voie chimique (Agarwal, 1993).

* 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.

* l'industrie des bio-carburants.

Très 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 (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.

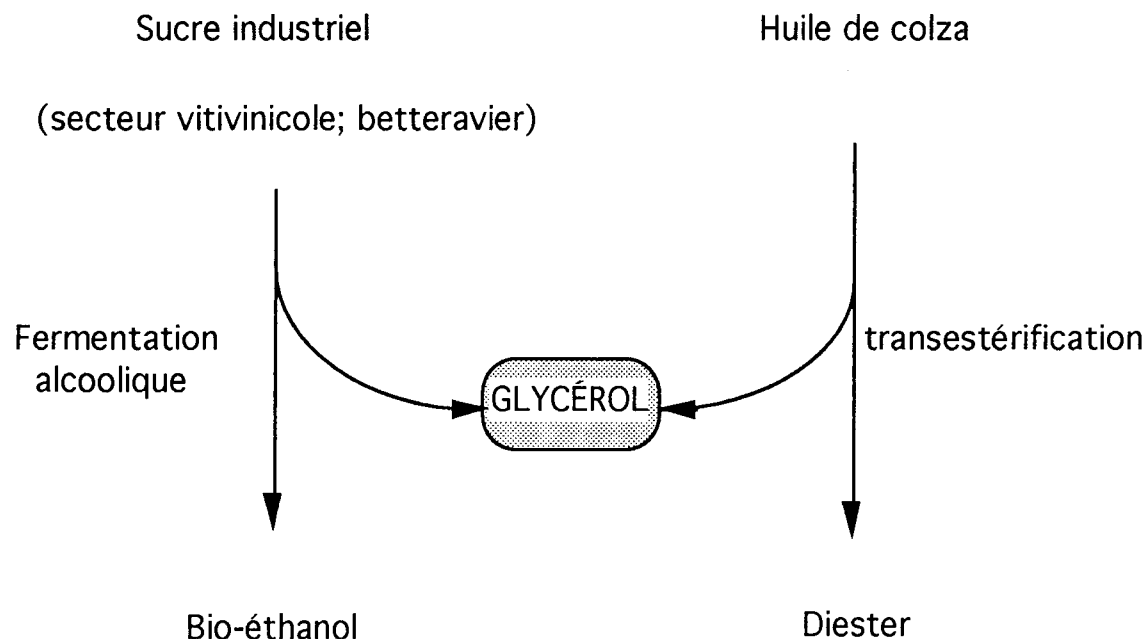


Figure 2. Production de glycérol associée aux nouvelles productions industrielles de biocarburants.

1.2. Utilisation du glycérol

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

Utilisation directe mettant à profit les propriétés physico-chimiques du glycérol.

- Formulation de cosmétiques hydratants.
- Élaboration d'encre, de peintures, de mastics, de colle...
- Additif alimentaire (conservateur et/ou édulcorant).
- Antigél.

Multifonctionnalité alcoolique permettant des applications après transformations chimiques.

- 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, utilisé comme plastifiant et en parfumerie.

Produits de transformations biologiques

Polyol à 3 atomes de carbone, le glycérol intervient, après transformation en dihydroxyacétone-phosphate 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 (métabolisme oxydatif des bactéries acétiques) et le 1,3-propanediol (réduction de la glycérine par certaines espèces d'*Entérobactéries* et de *Clostridia*).

II. MÉTABOLISME DU GLYCÉROL

II.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 dihydroxyacétone-phosphate (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 dihydroxyacétone (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.

II.2. Catabolisme du glycérol

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'Emden-Meyerhoff-Parnas.

Par contre, l'utilisation du glycérol par des 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.

II.2.1. Bactéries aérobies.

-*Bacillus subtilis*

Ce micro-organisme, aérobic strict, 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 glycérol (*glp*) (Beijer et coll., 1993) (**Figure 3**).

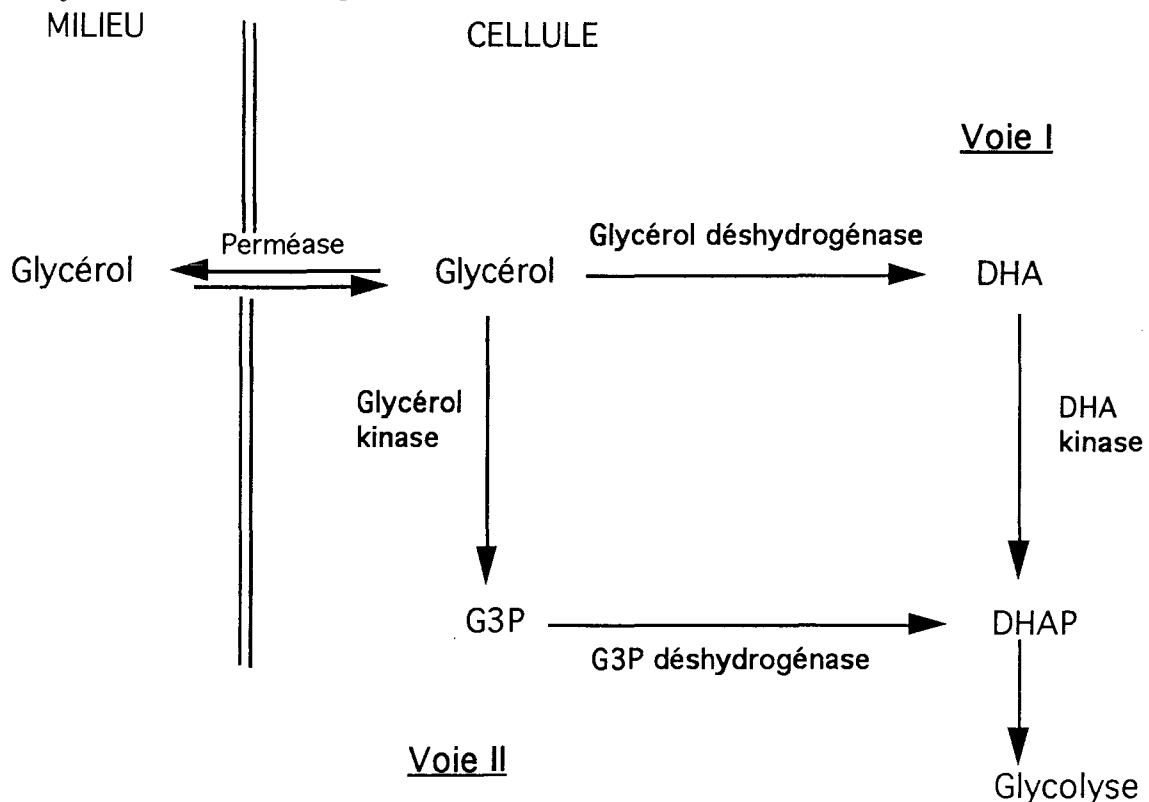


Figure 3. Catabolisme du glycérol chez *B. subtilis* (Lin, 1976).

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

La voie II est, elle, constituée d'une glycérol kinase (EC 2.7.1.30. ATP : glycérol-3-phosphotransférase) et d'une glycérol-3-phosphate déshydrogénase NAD⁺-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 (voie I) seraient, elles, constitutives et soumises à une répression catabolique par le glucose.

-Pseudomonas aeruginosa.

L'assimilation du glycérol chez ce micro-organisme est assurée par la voie du glycérol-3-phosphate et contrôlée par l'activité de l'enzyme inductible assurant le transport du glycérol dans la cellule et de la glycérol kinase (Tsay et coll., 1971).

II.2.2. 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**).

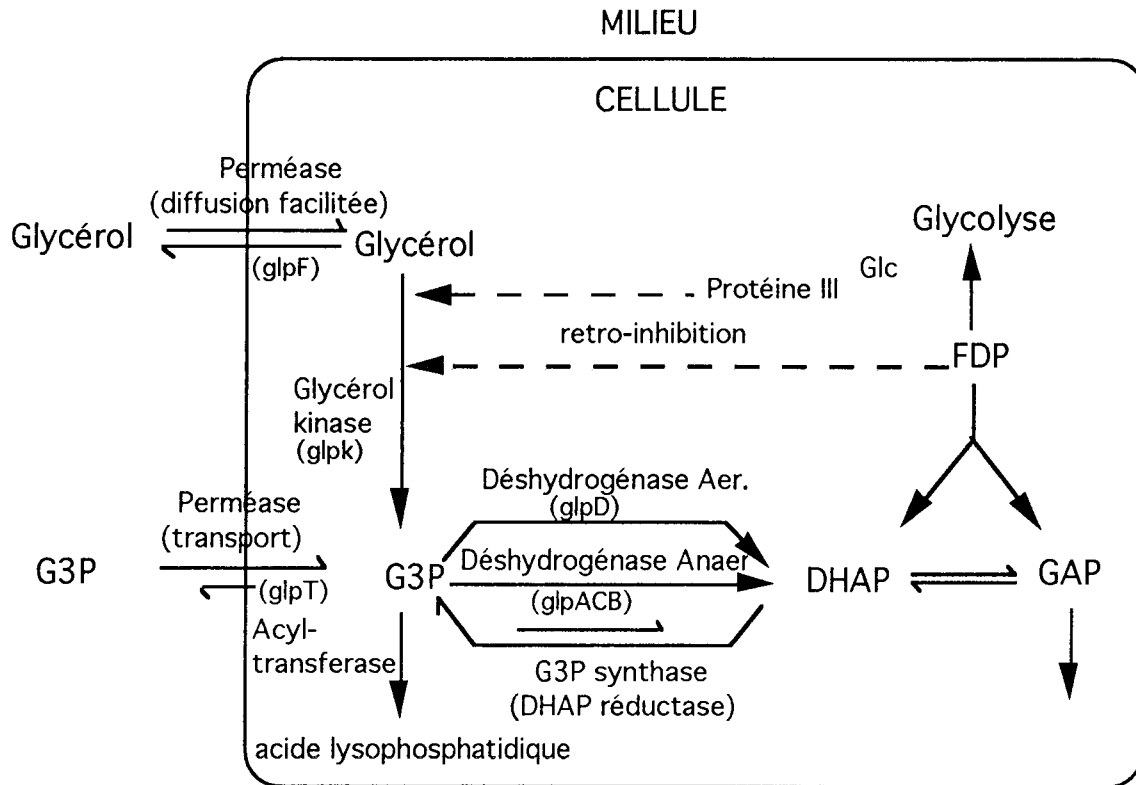


Figure 4. Métabolisme du glycérol et du G3P chez *E. coli*
(d'après Luchi et coll., 1990)

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). La protéine de perméation du glycérol a une masse molaire, calculée à partir de la composition en acides aminés, de 29 780 (Weissenborn et coll., 1992).

A l'intérieur de la cellule, le glycérol est, tout d'abord, transformé en G3P par une glycérone kinase ATP-dépendante et activée par l'ion Mg^{2+} . 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 co-facteurs (Kistler et coll., 1969; Pike et Sojka, 1975).

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 glycérone déshydrogénase anaérobie nécessite le fumarate ou le nitrate (Asnis et Brodie, 1953, Asnis et coll., 1956; St Martin et coll., 1977).

Les protéines de transport ainsi que celles 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 *glpF,K*

glpK : glycérol kinase

glpF : protéine facilitant le transport du glycérol

- opéron *glpT,A*

glpT : protéine facilitant le transport du G3P

glpA : G3P déshydrogénase anaérobie

- opéron *glpD*

glpD : G3P déshydrogénase aérobie

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

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

- 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; Hayashi et coll., 1965a). 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).

- 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, la constante d'inhibition 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^{Glc} (appelée aussi protéine IIA) du système PTS sous sa forme non-phosphorylée (De Boer et coll., 1986) ce qui explique pourquoi le glucose gêne l'utilisation du glycérol chez *E. coli*.

- *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 elle aussi utilisée, en condition anaérobie, 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) et Neijssel et coll. (1975).

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

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 l'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 phosphoryl terminal de l'ATP à des groupements hydroxyle du substrat, formant ainsi le glycérol-3-phosphate. La valeur de K_m pour son substrat physiologique est de 10 μM (Jin et coll., 1982).

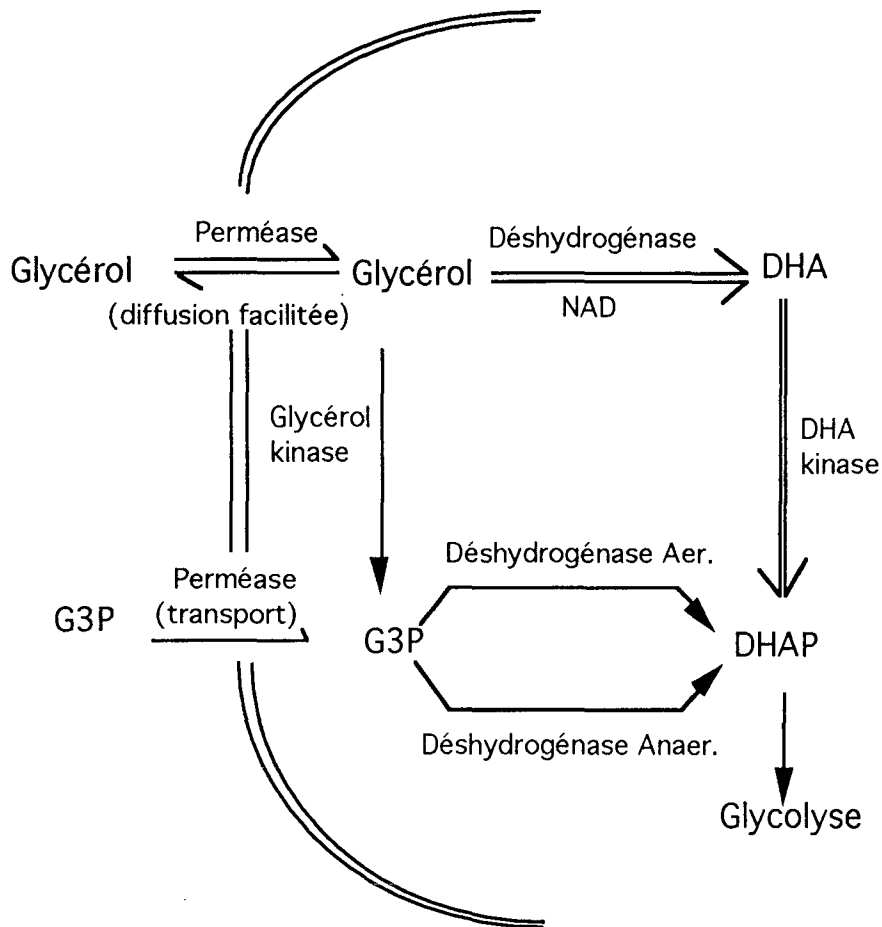


Figure 5. Métabolisme du glycérol et du G3P chez *K. pneumoniae* (d'après LIN, 1976)

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^+ -dépendante qui oxyde le glycérol en DHA puis cette dernière est phosphorylée en DHAP par la DHA kinase ATP-dépendante, la glycérol déshydrogénase coenzyme B_{12} -dépendante convertit le glycérol en 3-hydroxypropionaldéhyde (3HPA), ce dernier sera réduit en 1,3-propanediol par la 1,3-propanediol déshydrogénase NAD^+ -dépendante.

La glycérol déshydrogénase (glycérol : NAD^+ oxydoréductase, EC 1.1.1.6) a été partiellement purifiée et caractérisée par Mc Gregor et coll. (1974). Plus tard, Ruch et coll. (1980) déterminent sa masse molaire qui est de 79 000. Cette enzyme a été décrite comme une enzyme NAD^+ -dépendante ayant un pH optimal de 9. De plus, elle a une stabilité relative à la température et est très sensible à l'oxygène (Lin et coll., 1960). Cette protéine est activée par les cations monovalents (NH_4^+ , K^+ ou Rb^+) et inhibée par les cations divalents (en particulier par l'ion Zn^{2+}) (Johnson et coll., 1985; Lin et Magasanik, 1960). La glycérol déshydrogénase de *K. pneumoniae* montre une faible spécificité vis-à-vis du substrat. En effet, la valeur du K_m pour le glycérol (à pH 9,5) est de 13 mM. Par contre, pour la réaction inverse, la valeur du K_m

pour la DHA est de 0,13 mM et des concentrations supérieures à 0,4 mM entraînent une inhibition de la réaction (Strickland et Miller, 1968).

La DHA kinase (EC 2.7.1.29) se différencie de la glycérol kinase par sa très forte affinité pour la DHA (Ruch et coll., 1974). Cette enzyme a été purifiée et caractérisée par Johnson et coll. (1984). C'est un dimère de poids moléculaire 53 000 Daltons qui est très spécifique de son substrat (K_m de 4 μ M). En tant que cofacteur cationique, le Ca^{2+} permet une meilleure activité enzymatique que le Mg^{2+} .

Le NADH produit par ces réactions est en partie régénéré par une voie parallèle qui implique la conversion du glycérol en 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA) (Abeles et coll., 1960) par une diol déshydrogénase dépendante du coenzyme B₁₂ (Schneider et Pawelkiewicz, 1966; Schneider et coll., 1970), suivie d'une réduction du 3-HPA en 1,3-propanediol par la 1,3-propanediol oxydoréductase NAD⁺-dépendante.

Cette diol déshydratase a été purifiée par Poznankaya et coll. (1979) chez *K. pneumoniae* ATCC 8724. Sa masse molaire est de 230 000 et la protéine est composée de deux sous-unités F et S. Elle agit non seulement sur le 1,2-propanediol et le 1,2-éthanediol mais également sur le glycérol, le 1,2-butanediol et le 2,3-butanediol (Toraya et coll., 1977). Forage et Foster (1979) étudient les propriétés physiques et chimiques de ces déshydratases chez *K. pneumoniae* ATCC 25 955, ils différencient la diol déshydratase (1,2-propanediol hydro-lyase: EC 4.2.1.28) de la glycérol déshydratase (glycérol hydro-lyase: EC 4.2.1.30). Ces deux protéines, de masses molaires identiques, présentent des différences importantes sur le plan structural. Elles ont en commun l'inactivation irréversible par l'oxygène moléculaire et l'activation par l'ion K⁺. Ces mêmes auteurs montrent, en 1982, que les gènes structuraux de ces deux enzymes sont sous un contrôle indépendant. Il existe un inducteur spécifique pour chaque protéine. Le 1,2-propanediol et le 1,2-éthanediol induisent seulement la diol déshydratase tandis que la glycérol déshydratase est induite par la DHA.

L'apoenzyme de la glycérol déshydratase est formée de deux sous-unités A et B, se combinant de façon stoechiométrique et de masses molaires 22 000 et 240 000. La sous-unité A, thermostable et ne contenant pas de groupement actif thiol, se dissocie à des pH inférieurs à 7 ou en solution de faible force ionique, en unités de poids moléculaire de 12 000 Daltons. Par contre la sous-unité B est stable uniquement à des températures inférieures à 70 °C et porte des groupements thiols actifs. L'holoenzyme est composée de l'apoenzyme et du cofacteur B₁₂: le complexe formé avec l'hydroxycobalamine est stable mais inactif. En présence de Mn²⁺ et SO₄²⁻, l'holoenzyme est activée par le remplacement de l'hydroxycobalamine par du coenzyme B₁₂ (adénosylcobalamine) (Schneider et coll., 1970; Poznanskaya et coll., 1977).

Un pH de 8,0 et une température de 37 °C sont les conditions permettant une activité enzymatique optimale (Pawelkiewicz et Zagala, 1965). Du point de vue cinétique, la conversion du glycérol est une réaction du second ordre caractérisée par un K_m de 1,8 mM (Pawelkiewicz et Zagalak, 1965).

Le 1,3-propanediol est formé à partir du 3-HPA, par une enzyme NAD⁺-dépendante. Cette 1,3-propanediol NAD⁺-oxydoréductase (1,3-propanediol déshydrogénase : EC 1.1.1.202) a été purifiée et caractérisée par Johnson et Lin (1987). Elle se distingue immunochimiquement de la glycérol déshydrogénase NAD⁺-dépendante. La protéine est formée d'un octamère ou d'un hexamère d'un polypeptide de 45 000 Daltons. Cette enzyme est activée par des cations divalents (Mn²⁺ et Fe²⁺) (Johnson et Lin, 1987). L'activité enzymatique est toujours mesurée dans le sens non physiologique car le 3-HPA (substrat physiologique) est un composé instable. Les K_m pour le 1,3-propanediol et le NAD⁺ sont respectivement de 18 mM et 0,31 mM. En conditions aérobies, cette protéine, ainsi que les autres oxydoréductases fonctionnant en absence d'oxygène, sont inactives (Johnson et coll., 1985).

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).

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.

* 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).

* 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).

* La glycérol déshydrogénase et la glycérol kinase sont soumises à une forte répression catabolique par le glucose (Ruch et Lin, 1975).

* Au niveau enzymatique, la glycérol kinase est rétro-inhibée par le fructose-1,6-diphosphate (Ruch et coll., 1974).

* L'inactivation irréversible de la glycérol déshydrogénase dans des conditions aérobie est un mécanisme de régulation du catabolisme de ce substrat (Lin et coll., 1960).

- *Citrobacter freundii*

Mickelson et Werkman (1940) ont établi qu'en anaérobie, *Citrobacter freundii* se développait sur le glycérol et que la croissance était accompagnée de la production de 1,3-propanediol ainsi que des acides lactique, acétique, succinique et formique. 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 de ce même substrat, via le pyruvate, en acides et alcools.

La conversion du glycérol en pyruvate par la voie de la glycolyse conduit à la formation d'1 mole d'ATP et de 2 moles de NADH (**Figure 6**). Ce 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 du pyruvate par une pyruvate lyase (Cooper, 1984).

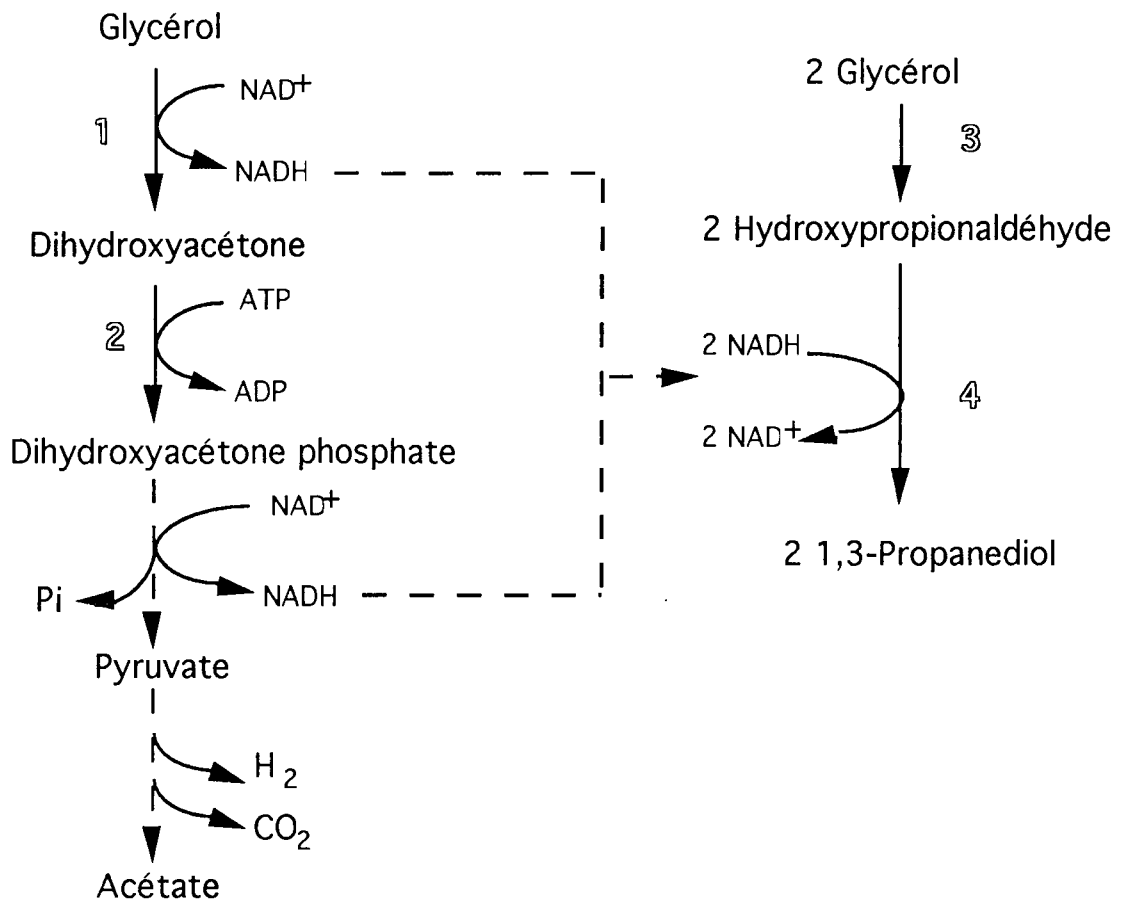


Figure 6. Maintien de l'équilibre d'oxydoréduction chez *Citrobacter freundii* par association des voies métaboliques de production d'acide acétique et de 1,3-propanediol (Mickelson et Werkman, 1940)

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

Le *dha* régulon 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 7).

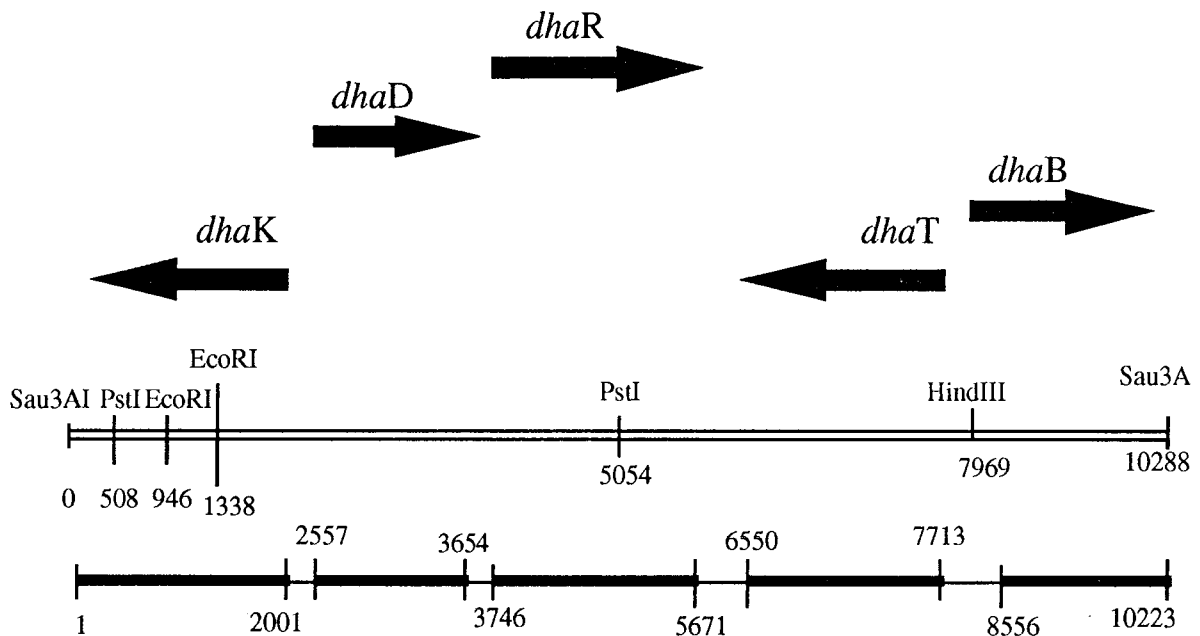


Figure 7. Schéma du *dha* régulon de *Citrobacter freundii* d'après Daniel et coll. (1995b).

La glycérol déshydrogénase (EC 1.1.1.6) de *Citrobacter freundii* est un hexamère de 43 000 Da. Les K_m apparents pour le glycérol et le NAD^+ sont respectivement de 1,27 mM et 57 μM . La région du DNA codant pour le gène (*dhaD*) 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 mais une faible homologie avec les alcool déshydrogénases du type III (FAD-dépendantes alcool oxydases, qui catalysent l'oxydation irréversible des alcools).

La dihydroxyacétone kinase (EC 2.7.1.29) de *Citrobacter freundii* est un dimère de 57 000 Da. L'enzyme présente une haute spécificité pour la dihydroxyacétone et l'ATP et les K_m apparents sont respectivement de l'ordre de 30 et 70 μM . 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 significative avec d'autres protéines.

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 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 B₁₂-dépendante chez *E. coli* deux conditions sont nécessaires :

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

La 1,3-propanediol NAD⁺-oxydoréductase de *Citrobacter freundii* a été purifiée, clonée, séquencée et surexprimée chez *E. coli* par Daniel et coll. (1995a). La protéine est formée d'un octamère ou d'un hexamère d'un polypeptide de 43 400 Daltons. Cette enzyme est activée par le Fe²⁺. Les *K_m* pour le 3-hydroxypropionaldehyde et le NADH sont respectivement de 140 et 33 μM. Le gène *dhaT*, codant pour cette enzyme, a été cloné et séquencé chez *E. coli*. Le polypeptide, de 387 acides aminés, obtenu montre une haute similitude avec les alcools déshydrogénases du type III (FAD-dépendantes alcool oxydases, qui catalysent l'oxydation irréversible des alcools).

Le gène *dhaR*, situé en aval du gène *dha D*, codant pour un polypeptide de 641 acides aminés jouant le rôle de represser.

L'expression des gènes structuraux du régulon *dha* est contrôlée d'une part, par un répresser ayant la DHA comme effecteur, et d'autre part, par répression catabolique (Forage et Foster, 1982; Forage et Lin, 1982; Johnson et coll., 1984).

- *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 et consommatrice d'équivalents réducteurs (**Figure 8**).

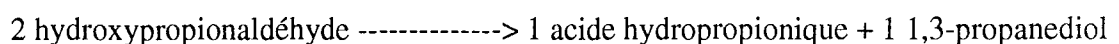
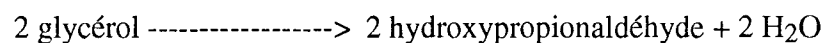
Ces caractéristiques métaboliques empêchent les lactobacilles de se développer sur glycérol seul. En présence de glucose, les bactéries assurent leur besoin énergétique par dégradation hétérolactique du substrat osidique et utilisent les coenzymes réduits formés pour la réduction du glycérol qui est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

Les enzymes impliquées dans la formation du 1,3-propanediol à partir de glycérol ont été purifiées et caractérisées chez *Lactobacillus reuteri* :

- La glycérol déshydratase a été décrite comme une enzyme de poids moléculaire 200 000 Da, formée de quatre sous-unités (52 000 Da). Les constantes d'affinité pour le glycérol et la vitamine B₁₂ sont respectivement 3,3 mM et 0,3 μM (Talarico et Dobrogosz, 1990).

- La 1,3-propanediol oxydoréductase à NAD⁺ est une enzyme de poids moléculaire 180 000 Da, formée de quatre sous-unités (41 000 Da) activée par le potassium mais inhibée par les autres cations mono ou divalents. Le 3-hydroxypropionaldéhyde, le glycérol, le 1,2 propanediol, l'acetol (hydroxyacétone, C₃H₆O₂) et la dihydroxyacétone sont des substrats potentiels de cette enzyme (Talarico et coll., 1990).

Devant la formation équimolaire d'acide 3-hydroxypropionique et de 1,3-propanediol par la souche *Lactobacillus* 208 A se développant sur glycérol comme seule source de carbone et d'énergie (Sobolov et Smiley, 1960). Ces auteurs suggèrent l'existence d'une dismutation aldéhydique.



Les voies métaboliques impliquées dans cette transformation équilibrée d'un point de vue oxydoréduction ainsi que celle assurant la synthèse d'énergie nécessaire à la croissance n'ont pas toutefois été précisées.

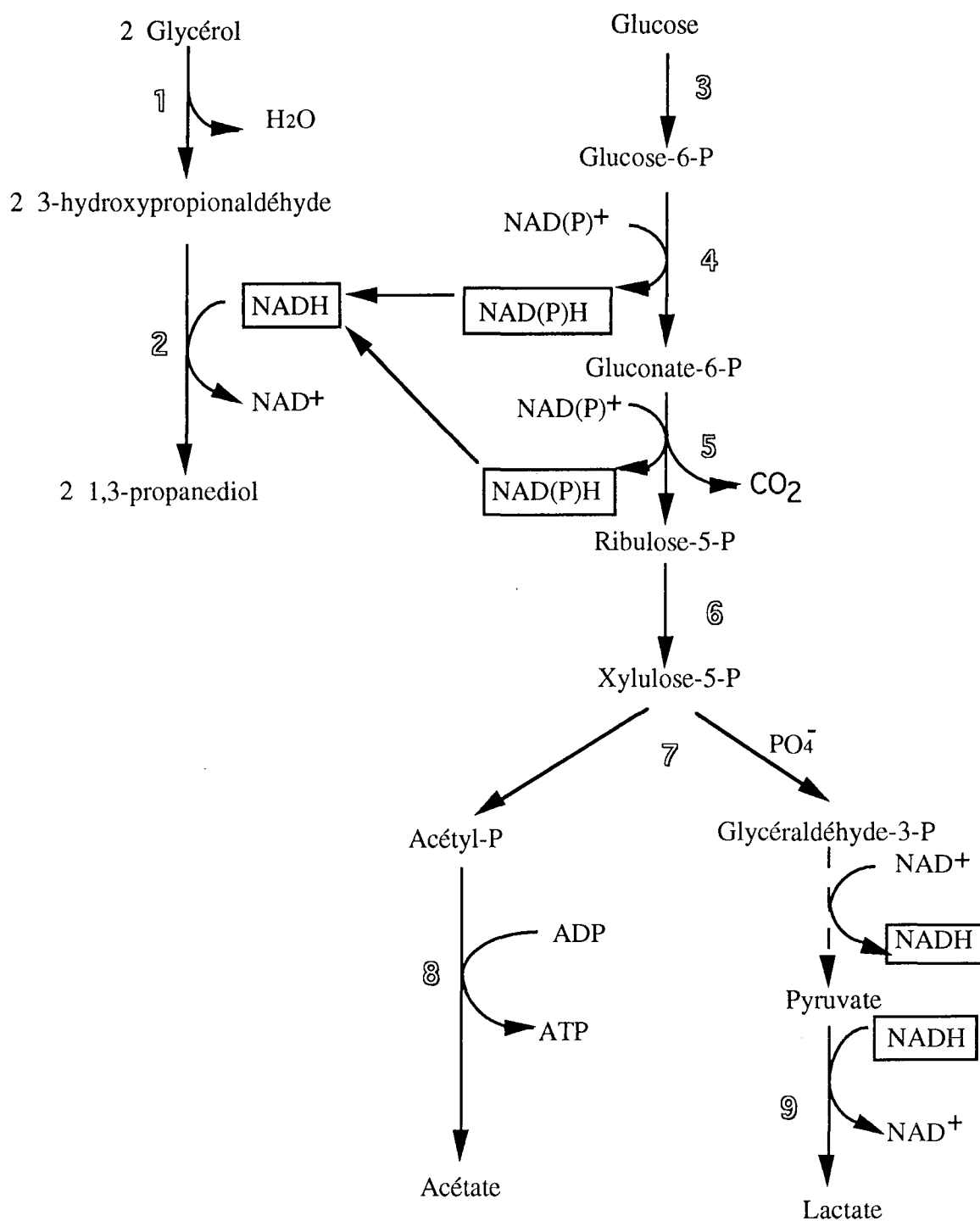


Figure 8 . Co-métabolisme du glycérol et du glucose chez *Lactobacillus* (Schütz et Radler, 1984).

1. Glycérol déshydratase.
2. 1,3-PD 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.

- *Salmonella typhimurium*.

Le système enzymatique de dégradation du glycérol chez cette bactérie pathogène est fortement similaire à celui d' *Escherichia 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).

II.2.3. Bactéries anaérobies strictes

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). 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 Gottschalk, 1986) et chez *Desulfovibrio fructosovorans* (Olivier 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).

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 (*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.

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 du glycérol détournée vers la synthèse de 1,3-propanediol pour assurer l'équilibre d'oxydo-réduction. Chez *C. butyricum* 1212t₂, ce rendement est de 65 % (Heyndrickx et coll., 1991b). Seul *C. pasteurianum*, se développant sur du glycérol, présente un rendement en 1,3-propanediol faible (6 %), une grande partie du glycérol (50 %) étant utilisée pour produire du n-

butanol (Heyndrickx et coll., 1991b). 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 CO₂ 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.

III. MÉTABOLISME DES SUCRES ET DU GLYCÉROL PAR *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM*

III.1. Caractéristiques du micro-organisme

III.1.1. 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.

III.1.2. 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 p-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 CO₂ et l'hydrogène sont les produits majeurs de fermentation (Heyndrickx et coll., 1989). Récemment, Heyndrickx et coll. (1991a) 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'H₂ et de 40 % de CO₂. Ces mêmes auteurs étudiant, en 1987, l'effet du pH sur des cultures discontinues de *C. butyricum*, observent une diminution de la production de H₂ et de CO₂ 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 élevés (> 6,0), deux nouveaux produits sont synthétisés : le lactate et le formiate, ces composés agissent comme accepteurs d'électrons additionnels. Pour Crabbendam et coll. (1985), deux conditions seulement entraînent une diminution du rapport acétate / butyrate :

- a) lorsqu'une culture continue limitée en glucose n'est pas sous barbotage d'azote
- b) dans une moindre mesure, lorsque des quantités croissantes de mannitol sont ajoutées à cette culture. Aucun changement dans la valeur du Y_{ATP} n'a cependant été observée.

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. (1991b) montrent qu'en culture en chemostat, ce micro-organisme convertit 65 % du glycérol en 1,3-PD 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-PD, 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). Chez *C. butyricum* CNCM 1.1211, une meilleure tolérance au glycérol est observée (138 g / l) (Claret, 1992). Malgré cela, des concentrations en 1,3-propanediol 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 comparées dans le tableau I.

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

Micro-organisme et conditions	Rendement molaire	Productivité moyenne g/l/h	Co-métabolites	Référence
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 2026; glycérol 96 g/l	0,54	2,3	Acétate, lactate, éthanol	Kretschmann et coll. (1990)
<i>Klebsiella oxytoca</i> DSM 3006; 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)
<i>Citrobacter freundii</i> glycérol 50 g/l	0,64	1,33	acétate, éthanol, lactate	Homann et coll. (1990)
<i>Citrobacter freundii</i> DSM 30039	0,64	-	acétate, lactate, éthanol	Kretschmann et coll. (1990)
<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	-	butyrate, propionate, acétate	Forsberg (1987)
<i>Clostridium butyricum</i> DSM 5431, glycerol	0,66	0,58	acétate, butyrate	Biebl (1991)
<i>Clostridium butyricum</i> VPI 3266	0,65	0,722	butyrate	Saint-Amans et coll (1994)

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 : 2,3 g/l.h . Ce résultat a été obtenu sur milieu

minéral supplémenté en extrait de levure contenant initialement 96 g/l de glycérol, à pH 7. Les autres micro-organismes étudiés présentent des productivités moins élevées, comprises entre 0,49 et 1,33 g / l . h.

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

III.2. 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). Ces sucres sont tout d'abord transformés en pentoses-5-phosphate et ensuite, via la séquence transcétolase / transaldolase, en fructose-6-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate, composé 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.

Chez *C. butyricum*, le glycérol est oxydé en dihydroxyacétone par l'intermédiaire d'une glycérol déshydrogénase NAD⁺-dépendante. Ce composé est ensuite phosphorylé en DHAP par une DHA kinase avant d'entrer dans la glycolyse. La conversion d'une mole de glycérol en pyruvate 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.

III.2.1. Réaction phosphoroclastique

Cette réaction, spécifique des *clostridia*, consiste en une décarboxylation oxydative du pyruvate (produit final de la glycolyse) 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 9**).

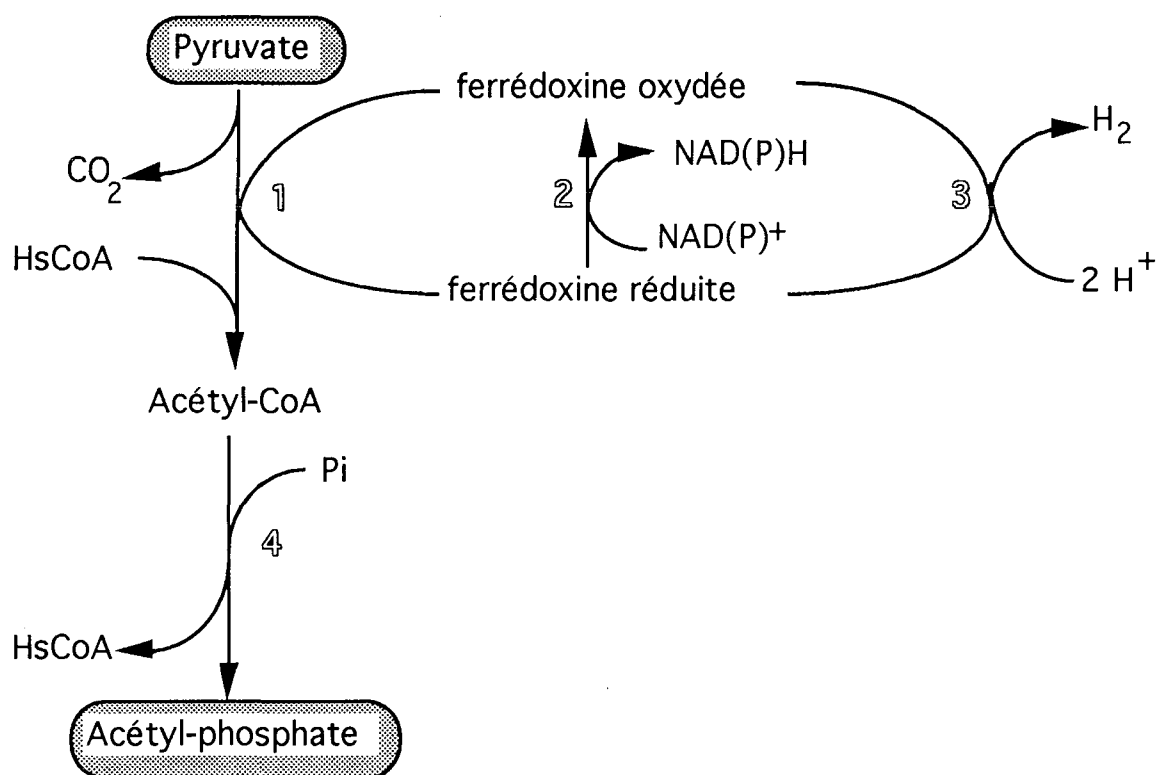


Figure 9. Réaction phosphoroclastique

1. Pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase. 2. Ferrédoxine-NAD(P)H réductase. 3. Hydrogénase. 4. Phosphotransacétylase.

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 (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 des voies métaboliques menant à la synthèse d'acétate, de butyrate et d'éthanol. Une partie de la ferrédoxine réduite peut aussi conduire à la formation de nucléotides réduits par des ferrédoxine-NAD(P)⁺ réductases (Petitdemange et coll., 1976).

III.2. 2. Flux métabolique du carbone vers les produits

III. 2.2.1. Voie de formation du 1,3-propanediol

Le glycérol est transformé en 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA) par une glycérol déshydratase coenzyme B₁₂-dépendante, le 3-HPA est ensuite réduit en 1,3-propanediol (1,3-

PD) par une 1,3-PD déshydrogénase NAD⁺-dépendante (**Figure 10**). Cette voie permet de régénérer les nucléotides réduits synthétisés par la voie de la glycolyse (Forage et Foster, 1982).

III. 2.2.2. Voies de production des acides et de l'éthanol

La conversion du glucose ou du glycérol, par la voie glycolytique classique, conduit à la production de pyruvate. Ce composé est le point de départ de voies métaboliques conduisant à la formation d'acétate, de butyrate et d'éthanol (**Figure 10**).

L'acétate est formé à partir de l'acétyl-CoA, lorsque la réaction phosphoroclastique est complète, par l'intermédiaire d'une phosphotransacétylase conduisant à la formation d'acétyl-phosphate. Ce composé mène ultérieurement, par l'action d'une acétate kinase, à la production d'acétate et d'une mole d'ATP.

L'éthanol est, lui aussi, obtenu directement à partir d'une mole d'acétyl-CoA par l'action de deux oxydoréductases NAD(P)H-dépendantes : une acétaldéhyde déshydrogénase réduisant l'acétyl-CoA en acétaldéhyde qui est ensuite transformé en éthanol par une éthanol déshydrogénase.

L'obtention de composés en C₄ se fait grâce à une activité thiolase permettant la formation d'acétoacétyl-CoA après condensation de deux molécules d'acétyl-CoA.

A partir d'acétoacétyl-CoA, une série de réactions enzymatiques est nécessaire pour aboutir à la formation du butyrate. L'acétoacétyl-CoA conduit successivement à la formation de β -hydroxybutyryl-CoA par une β -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase et de crotonyl-CoA par une crotonase. Ce dernier produit est réduit en butyryl-CoA par une butyryl-CoA déshydrogénase. Au cours de ces deux étapes, 2 moles de NADH sont consommées. Les réactions menant du butyryl-CoA au butyrate sont similaires à celles qui convertissent l'acétyl-CoA en acétate : une phosphotransbutyrylase transforme le butyryl-CoA en butyryl-phosphate, le butyrate étant ainsi produit, via une butyrate kinase, avec synthèse d'une mole d'ATP.

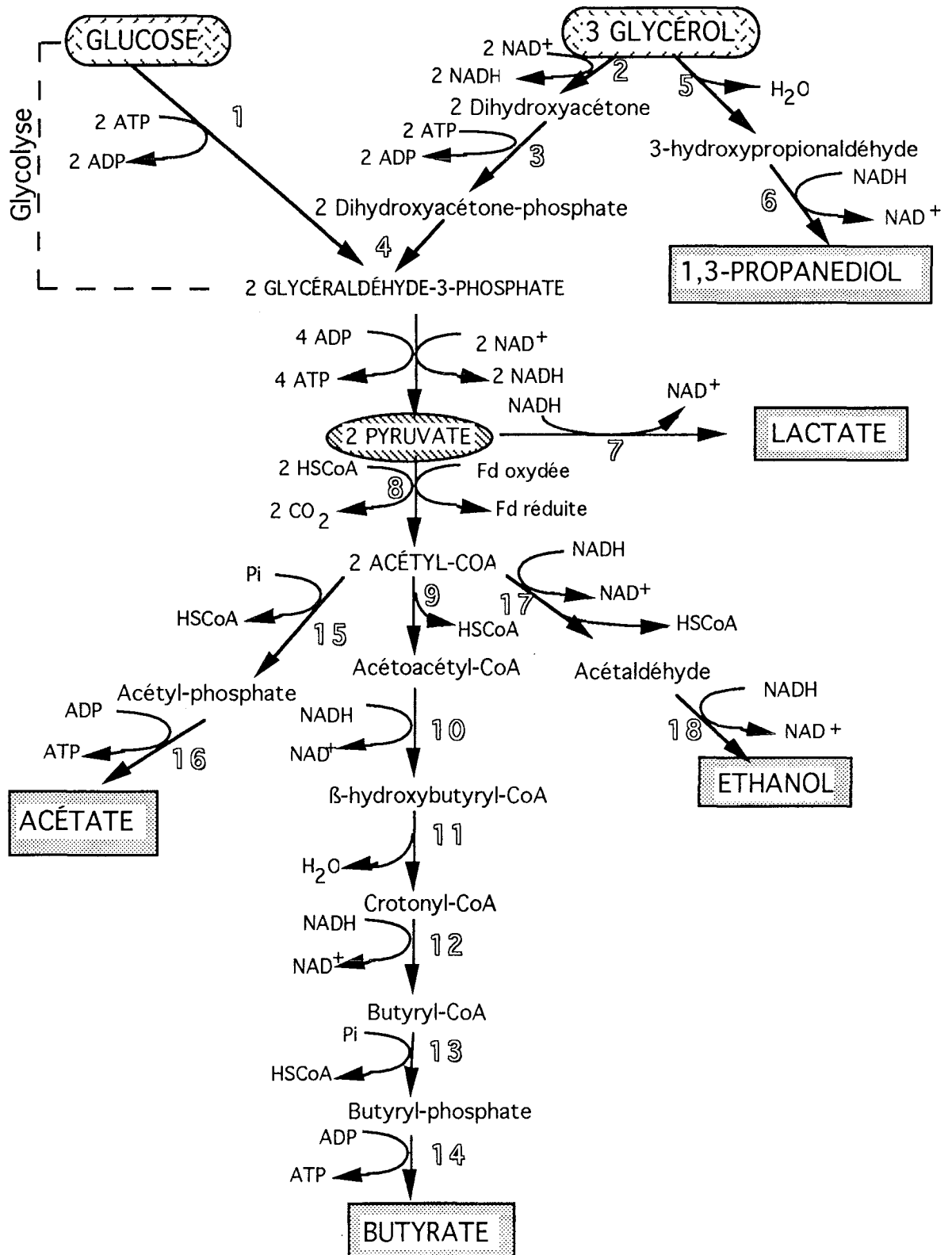


Figure 10. Flux de carbone chez *C. butyricum* (Zeng, 1996).

1.Voie de la glycolyse; 2.Glycéról déshydrogénase; 3.DHA kinase; 4.Triosephosphate isomérase; 5.Glycéról déshydratase; 6.1,3-propanediol déshydrogénase; 7.Lactat déshydrogénase; 8.Pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase; 9.Thiolase; 10.β-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase; 11.Crotonase; 12.Butyryl-CoA déshydrogénase; 13. Phosphotransbutyrylase; 14. Butyrate kinase; 15.Phosphotransacétylase; 16.Acétate kinase; 17.Acétaldéhyde déshydrogénase; 18.Ethanol déshydrogénase.

III.2.3. Flux métabolique d'électrons.

Les bactéries anaérobies strictes, comme les *clostridia*, sont dépourvues de système à cytochrome C. De ce fait, elles assurent leur croissance grâce à une stratégie de fermentation qui associe une production d'énergie couplée à l'oxydation du glycérol en pyruvate et une régénération des coenzymes réduits (produits lors de cette conversion), soit par transformations de l'acide pyruvique en composés réduits, soit par utilisation du système de distribution des électrons vers la production d'hydrogène.

Ces micro-organismes possèdent, en effet, un système particulier de distribution d'électrons. Celui-ci est composé d'une protéine à fer-soufre, la ferrédoxine, transporteur physiologique d'électrons, d'une NADH-ferrédoxine réductase capable d'oxyder ou de réduire le NAD^+ et la ferrédoxine, d'une NADPH-ferrédoxine oxydoréductase, qui contrôle la formation du NADPH nécessaire aux biosynthèses cellulaires (Jungermann et coll., 1973; Petitdemange, 1976), et d'une hydrogénase utilisant les protons comme derniers accepteurs d'électrons.

La ferrédoxine a été isolée pour la première fois chez *C. pasteurianum* (Mortenson et coll., 1962), la ferrédoxine des *clostridia* est une petite protéine de masse molaire d'environ 6 000, contenant 8 atomes de fer, 8 atomes de soufre et pas de flavine. Il s'agit d'une molécule relativement stable qui supporte le stockage pendant plusieurs jours. Elle a un potentiel d'oxydoréduction apparent de $-423 \pm 1,5$ mV avec une variation de -11,5 mV par unité pH (Moulis et Meyer, 1982). La séquence en acides aminés de la ferrédoxine de *C. pasteurianum* a été déterminée par clonage et séquençage de son gène chez *E. coli* (Graves et coll., 1985; Fujinaka et Meyer, 1993).

La ferrédoxine, transportant deux électrons par molécule, se situe au centre de deux systèmes de distribution d'électrons présents selon les conditions de croissance (**Figure 11**).

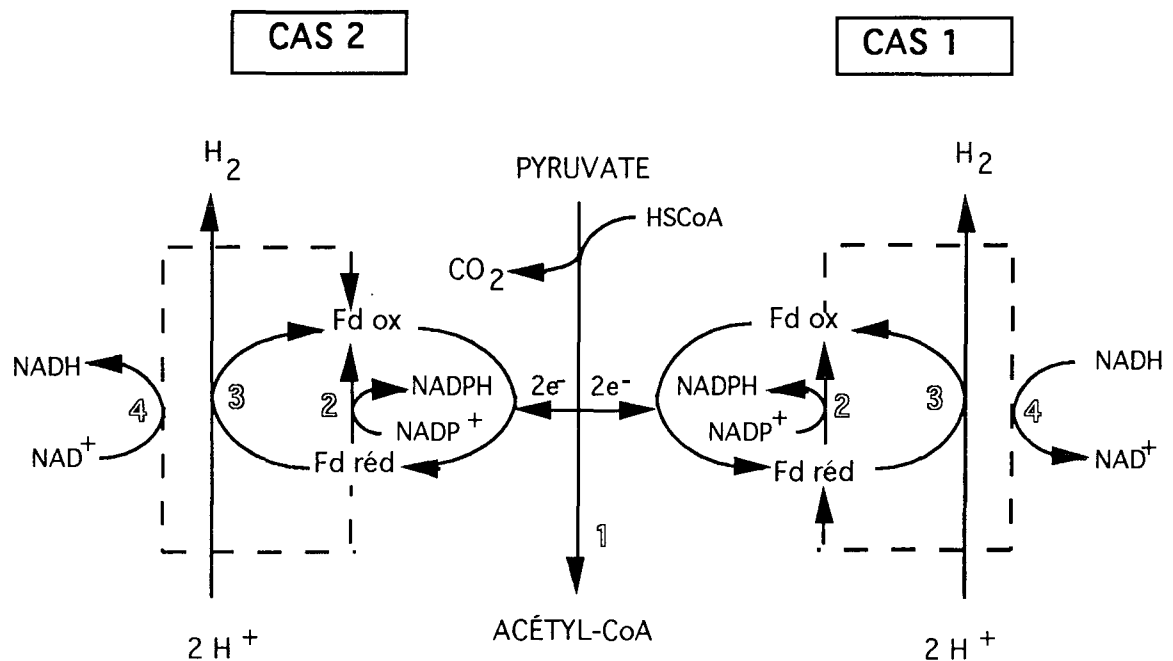


Figure 11. Flux d'électrons chez *C. butyricum* (Vasconcelos, 1991).

1. Pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase; 2. Ferrédoxine-NADPH réductase; 3. Hydrogénase; 4. Ferrédoxine-NADH oxydoréductase.

En effet, pendant la croissance de la bactérie la ferrédoxine est réduite, soit par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase lors du clivage phosphoroclastique du pyruvate en acétyl-CoA, soit par la NADH-ferrédoxine réductase; l'excès de NADH formé au cours de la glycolyse étant ainsi éliminé (cas 1). La production d'hydrogène via l'hydrogénase est alors la principale voie de réoxydation de la ferrédoxine. Cette régénération est aussi accomplie, mais dans une moindre mesure, par la ferrédoxine-NADP⁺ réductase, seule voie de synthèse de NADPH pour la cellule (Jungermann et coll., 1973; Petitdemange, 1976).

Chez *C. butyricum*, lorsque les nucléotides réduits provenant du catabolisme du glycérol sont insuffisants pour la synthèse du butyrate et du 1,3-propanediol, la ferrédoxine est uniquement réduite au cours de la réaction phosphoroclastique (cas 2) et son oxydation par la ferrédoxine-NAD⁺ réductase est le moyen d'obtenir le NADH nécessaire aux voies consommatrices. Dans ce cas, il n'y a pas, ou très peu, de production d'hydrogène.

Une seconde protéine transporteur d'électrons, la rubrédoxine, identifiée chez *C. pasteurianum* à la suite de travaux relatifs à la ferrédoxine (Mortenson, 1964), est aussi présente dans plusieurs espèces de *clostridia* (Petitdemange et coll., 1981).

Cette protéine à fer-soufre, de masse molaire semblable à celle de la ferrédoxine, contient 1 atome de fer combiné avec 4 résidus de cystéine dans la chaîne peptidique. La rubrédoxine transporte un seul électron par molécule et peut se substituer à la ferrédoxine dans quelques réactions d'oxydoréductions généralement à des vitesses plus faibles (Marczak et coll., 1983, 1985) mais son rôle physiologique reste à préciser. Cependant, chez *C. acetobutylicum*, l'apparente induction de la rubrédoxine ainsi que celle de la NADH-rubrédoxine réductase par des conditions de culture associées à un faible pH et des fortes concentrations en acides suggère que ces deux protéines participent à une chaîne de transport d'électrons dont le donneur d'électrons est le NADH (Marczak et coll., 1983, 1984).

III.3. Métabolites inhibiteurs

III.3.1. Les acides acétique et butyrique

L'inhibition des *clostridia* par les acides a été étudiée de manière intensive (Baronofsky et coll., 1984; Herrero et coll., 1985; Fond et coll., 1985; Huesemann 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 (0,49 g / l d'acide non dissocié), 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., 1985; 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 2,7 fois plus grande que celle obtenue avec l'acide butyrique ajouté dans le milieu de culture (Zeng et coll. 1994).

Les concentrations critiques d'acide acétique pour la fermentation du glycérol par *C. butyricum* sont beaucoup plus raisonnables que celles décrites pour d'autres fermentations (Fond et coll., 1985; Tang et coll., 1989; Zeng et coll., 1990).

Il a été démontré que l'inhibition par l'acide acétique est due à sa forme non-dissociée (Huesemann et Papoutsakis, 1986; Tang et coll., 1989; Zeng et coll., 1990). L'inhibition de la croissance par l'acide acétique sous sa forme dissociée ou non peut être décrite pour la fermentation du glycérol (Zeng et coll., 1994).

L'inhibition de la 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 (Huesemann et Papoutsakis, 1986). Quand la concentration intracellulaire des formes non dissociées devient trop élevée, le gradient de pH à travers la membrane est aboli et de ce fait les fonctions métaboliques sont inhibées (Baronofsky et coll., 1984; Herrero et coll., 1985).

Récemment, 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. Quoique 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 en diminuant le pH, à pH neutre, il observe une augmentation de la production d'acétate et une diminution de la production du butyrate avec augmentation du taux de dilution. Ces résultats peuvent être compris en comparant l'inhibition par les différents produits à différents pH, à faible pH, l'acétate étant plus toxique que le butyrate, la production d'acide butyrique est préférentielle.

III.3.2. Les alcools

La fermentation du glycérol en 1,3-propanediol, acétate et butyrate chez *C. butyricum* a été étudiée de manière à quantifier l'inhibition par les produits formés (Biebl, 1991). Dans les conditions testées, la croissance est totalement inhibée par 60 g / l de 1,3-PD. Une inhibition appréciable par le glycérol n'a lieu qu'à des concentrations supérieures à 80 g / l. Récemment, Saint-Amans et coll. (1994) ont pu obtenir, en culture en fed-batch, des concentrations en 1,3-propanediol supérieures à 65 g / l.

Le glycérol est connu pour entrer dans la cellule grâce à une perméase par un mécanisme de diffusion facilitée (Sanno et coll., 1968), de plus, il serait un soluté osmorégulateur. En

effet, il a déjà été montré que des concentrations croissantes en polyols et polyamides augmentaient l'osmolarité du milieu de croissance (Csonka, 1981). 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). Lorsque le glycérol est présent, les membranes seraient moins polarisées qu'en présence de glucose, ces changements à la surface de la bicouche lipidique affectent les propriétés de perméation, ceci à cause d'une distribution de charges à l'interface qui génère un potentiel de surface.

L'inhibition très marquée de la croissance par le 1,3-PD 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-PD est très inhibiteur (42 fois plus inhibiteur que le 1,2-PD), le glycérol a le même effet que le 1,2-PD. L'hypothèse tendant à montrer que la cellule aurait une perméabilité décroissante aux alcools dont le nombre de groupements hydroxyls augmente est controversée par le fait que le glycérol est moins inhibiteur que le 1,3-PD. Ces auteurs suggèrent donc que l'effet inhibiteur très marqué de ce dernier est lié à la structure de la dihydroxyacétone ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$) proche de celle du 1,3-PD ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$). Il existerait une compétition vis à vis du substrat pour une enzyme du métabolisme.

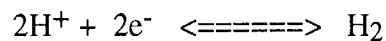
Plus récemment, il a été montré que les alcools affectaient l'organisation membranaire de plusieurs micro-organismes en augmentant la fluidité membranaire et en modifiant l'interaction lipide-lipide et lipide-protéine (Jain et coll., 1978; Linden et Moreira, 1982). Ingram et Buttke (1984) rapportent que la toxicité de ces alcools est directement liée, non seulement à leur longueur de chaîne, 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). La capacité des alcools à augmenter la fluidité membranaire est proportionnelle à leur hydrophobicité, les alcools à courtes chaînes, à dominante polaire, vont 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-PD 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'interactions spécifiques.

IV. PROPRIÉTÉS ET RÉGULATIONS DES ENZYMES IMPLIQUÉES DANS LA SYNTHÈSE DES PRODUITS DE FERMENTATION CHEZ LES *CLOSTRIDIA*.

IV.1. Le système de distribution d'électrons.

IV.1.1. Activités hydrogénasiques.

L'hydrogénase (hydrogène : ferrédoxine oxydoréductase, EC 1.12.7.1) est une enzyme clé du système de transport d'électrons chez les *clostridia*. Elle catalyse la formation d'hydrogène à partir de protons et d'électrons, ainsi que la réaction inverse :



La seule caractéristique commune à toutes les hydrogénases étudiées est le fait qu'elles soient des protéines à fer-soufre (Adams et coll., 1981).

Mortenson et ses collaborateurs (Chen et Mortenson, 1974; Nakos et Mortenson, 1971a, 1971b) ont purifié la première hydrogénase I du genre *Clostridium* (*C. pasteurianum*). Des travaux récents ont permis de montrer qu'il s'agit d'une enzyme cytoplasmique, monomérique et très sensible à l'oxygène (Adams et coll., 1989; Meyer et Gagnon, 1991). Elle possède 12 demi-résidus de cystéine par molécule et une prépondérance d'acides aminés acides; elle ne contient ni molybdène, ni cuivre, mais 20 atomes de fer et 18 atomes de soufre par molécule. Sa masse molaire, déterminée d'après cette composition est de 63 700.

Son rôle physiologique est de permettre l'élimination de l'excès d'électrons sous forme d'hydrogène moléculaire, la ferrédoxine étant le donneur d'électrons physiologique. Cependant, le méthyl viologène et le bleu de méthylène peuvent aussi servir de donneurs ou d'accepteurs d'électrons à l'enzyme purifiée.

Chen et Mortenson (1974) trouvent, qu'à la même concentration, la ferrédoxine est un donneur d'électrons beaucoup plus efficace que le méthyl viologène. Ceci s'explique par les valeurs de K_m de l'enzyme : 51 μM pour la ferrédoxine réduite et 6,25 mM pour le méthyl viologène réduit.

Une seconde hydrogénase de *C. pasteurianum*, qui catalyse préférentiellement l'oxydation de l'hydrogène, a été isolée par Chen et Blanchard (1978), cette enzyme est appelée hydrogénase II et son rôle physiologique reste à déterminer. Cette enzyme a une masse

moléculaire de 53 000, contient 8 atomes de fer et 8 atomes de soufre et est aussi capable de catalyser la formation d'hydrogène mais à des vitesses très faibles, en utilisant les mêmes transporteurs d'électrons que l'hydrogénase I (Adams et Mortenson, 1984; Chen et Blanchard, 1984).

L'hydrogénase de *C. butyricum* n'a pas encore été étudiée, ni au niveau de sa purification et caractérisation, ni au niveau de la régulation de son activité. Cependant, d'autres micro-organismes appartenant au genre *Clostridium* ont bénéficié de plus amples recherches.

Ainsi, pratiquement toutes les hydrogénases purifiées à ce jour sont inhibées par le monoxyde de carbone (CO), en raison d'une interaction de cette molécule avec l'atome de fer du site actif de l'enzyme qui mène à la formation d'un complexe FeCO (Adams et coll., 1981).

Le profil de l'activité hydrogénase, déterminé par Junelles et coll. (1988) au cours d'une fermentation discontinue de *C. acetobutylicum* ATCC 824 sur milieu synthétique, pH réglé à 4,8, est identique à celui obtenu par Kim et Zeikus (1985). L'activité maximale de l'enzyme est atteinte au début de la fermentation, elle reste constante pendant la phase acide et diminue lorsque la production des solvants commence. George et Chen (1983) ont aussi rapporté que des extraits acellulaires de *C. beijerinckii* provenant de cellules productrices de solvants présentent une activité hydrogénase inférieure à celle des extraits provenant de cellules productrices d'acides.

IV.1.2. Activités NADH et NADPH-ferrédoxine oxydoréductasiques

La découverte de la ferrédoxine chez *C. pasteurianum*, en 1962, par Mortenson et coll., a conduit plusieurs chercheurs à étudier la possibilité de réduction et d'oxydation des nucléotides pyridiniques par des enzymes à ferrédoxine chez les *clostridia*.

Valentine et coll. (1962) observent, chez *C. pasteurianum*, la présence d'une activité ferrédoxine-NADP⁺ réductase qui permet la réduction du NADP⁺ soit à partir de l'hydrogène, soit à partir du pyruvate. Cependant, aucune activité ferrédoxine-NAD⁺ réductase, ni un couplage NADH-ferrédoxine réductase / hydrogénase n'ont pu être mis en évidence. Plus tard, Valentine et coll. (1963) montrent que chez *C. acidi-urici*, le NAD⁺ (et non le NADP⁺) sert d'accepteur final des électrons libérés par l'oxydation du pyruvate.

Petitdemange et coll. (1970) étudiant la formation du butanol chez *C. acetobutylicum* chez qui il est montré que la réduction du butyraldéhyde en butanol nécessite du NADH, identifient la présence d'une ferrédoxine-NAD⁺ réductase dans les extraits acellulaires de la

bactérie. L'activité de cette enzyme permet d'expliquer pourquoi les *clostridia* du type "butylique" (ceux qui produisent essentiellement des produits neutres comme *C. acetobutylicum* et *C. butylicum*) dégagent moins d'hydrogène que les *clostridia* de type "butyrique" (ceux qui produisent essentiellement des acides acétiques et butyriques comme *C. butyricum*, *C. pasteurianum* et *C. tyrobutyricum*) : les éléments réducteurs non dégagés serviraient à produire du NADH. Une hypothèse a donc été émise selon laquelle les *clostridia* qui possèdent une activité ferrédoxine-NAD⁺ réductase seraient du type "butylique" et ceux qui n'en possèdent pas appartiendraient alors au type "butyrique". Mais l'année suivante, cette hypothèse fut détruite puisque ces mêmes auteurs détectent les deux activités ferrédoxine-NAD⁺ réductase et ferrédoxine-NADP⁺ réductase chez *C. acetobutylicum*, *C. butyricum* et *C. pasteurianum* (Petitdemange et coll., 1971a). La réduction de ces coenzymes est obtenue à partir de l'oxydation du pyruvate via la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase ou couplée à l'oxydation de l'hydrogène via l'hydrogénase.

Parallèlement à ces travaux, les activités NAD(P)H-ferrédoxine oxydoréductases ont été étudiées, Jungermann et coll. (1969) ainsi que Thauer et coll. (1969) observent que les extraits acellulaires de *C. kluyveri* catalysent la réduction de la ferrédoxine à partir de l'oxydation du NADH et du NADPH. L'étude de la régulation des activités NADH et NADPH-ferrédoxine oxydoréductasiques permet à ces auteurs de conclure que deux enzymes distinctes sont impliquées dans la réduction de la ferrédoxine à partir du NADH et du NADPH. De même, l'oxydation de la ferrédoxine par le NAD⁺ et par le NADP⁺ est catalysée par deux enzymes différentes (Jungermann et coll., 1971; Thauer et coll., 1971).

Jungermann et coll. (1973) se sont intéressés au rôle physiologique de ces quatre activités chez *C. pasteurianum* et *C. butyricum*. Considérant le cas des *clostridia* saccharolytiques, ces chercheurs attribuent à la NADH-ferrédoxine oxydoréductase et à la NADPH-ferrédoxine oxydoréductase les fonctions suivantes (**Figure 12**) :

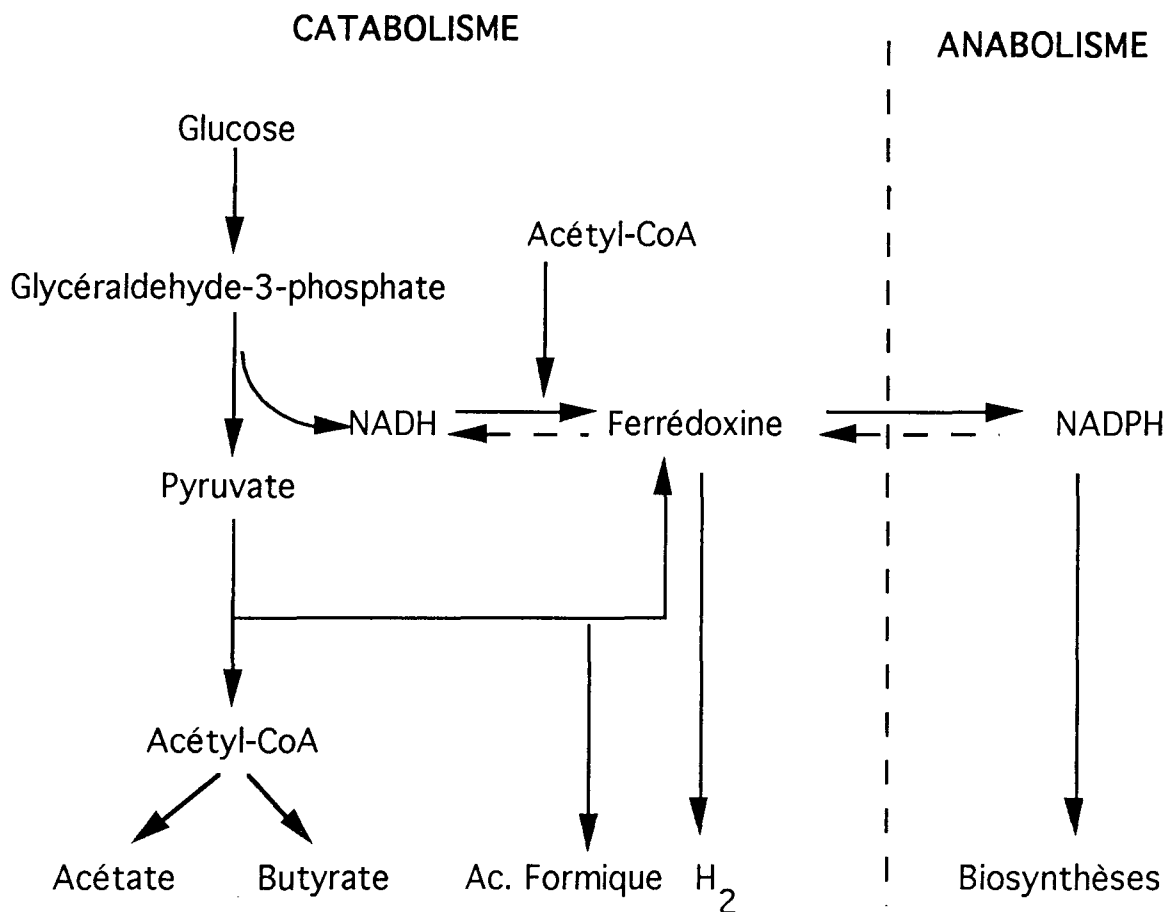


Figure 12. Fonctions de la NADH-ferrédoxine oxydoréductase et de la NADPH-ferrédoxine oxydoréductase dans le métabolisme des *clostridia* saccharolytiques (d'après JUNGEMANN et coll., 1973).

- une fonction anabolique à la NADPH-ferrédoxine oxydoréductase parce que l'activité ferrédoxine-NADP⁺ réductase est la seule source de NADPH dont disposent les cellules et parce que l'activité spécifique de l'enzyme fonctionnant dans le sens de l'oxydation du NADPH est faible.

- une fonction catabolique à la NADH-ferrédoxine oxydoréductase parce que l'activité spécifique de l'enzyme fonctionnant dans le sens de l'oxydation du NADH est supérieure (3 à 4 fois) à celle obtenue lorsqu'elle fonctionne dans le sens de la réduction du NAD⁺. De plus, la forte inhibition de l'activité ferrédoxine-NAD⁺ réductasique par le NADH interdit son fonctionnement.

Pour Petitdemange et coll. (1976), cette différence d'activité entre les deux directions de la NADH-ferrédoxine oxydoréductase peut être essentiellement attribuée aux conditions expérimentales du dosage utilisant l'activité hydrogénase pour réduire la ferrédoxine. De plus,

l'inhibition de l'activité ferrédoxine-NAD⁺ réductase par le NADH ne serait pas un obstacle à son fonctionnement mais plutôt un mode de régulation très efficace de l'activité enzymatique (Petitdemange et coll., 1971a; 1971b).

C. acetobutylicum possède une NADH-ferrédoxine oxydoréductase dont les activités spécifiques et les régulations des activités ferrédoxine-NAD⁺ réductasique et NADH-ferrédoxine réductasique sont semblables. Ces résultats conduisent Petitdemange (1976) à la conclusion que la présence de la NADH-ferrédoxine oxydoréductase, fonctionnant réversiblement, est essentielle au métabolisme de la bactérie et lui permet de s'adapter aux différentes conditions de culture. Quand il y a formation de solvants la cellule a besoin d'un complément en NADH, alors que dans le cas où les acides sont les produits majoritaires elle doit éliminer le NADH qui n'est pas utilisé. La régulation de l'activité ferrédoxine-NAD⁺ réductase par le NADH permet à l'enzyme de fonctionner en relation avec la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et de contrôler les teneurs en NAD⁺ et NADH dans la cellule. Ceci est confirmé par le fait que *C. tyrobutyricum* cultivé sur pyruvate et acétate ne possède pas d'activité NADH-ferrédoxine réductase et que la régulation de l'activité ferrédoxine-NAD⁺ réductase par le NADH disparaît. En effet, dans ces conditions la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase n'est pas fonctionnelle et un excès de NADH ne peut pas se produire.

L'activité des trois enzymes, hydrogénase, NADH-ferrédoxine oxydoréductase et NADPH-ferrédoxine oxydoréductase, est ainsi responsable du contrôle du flux métabolique d'électrons, lequel détermine la direction du flux de carbone dans la cellule.

IV.2. Activités des enzymes impliquées dans le métabolisme intermédiaire.

IV.2.1. La pyruvate déshydrogénase.

La pyruvate déshydrogénase (pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase, EC 1.2.7.1) des *clostridia* est très instable et sensible à l'oxygène. Contrairement aux pyruvate déshydrogénases des bactéries aérobies, elle ne contient ni flavine, ni acide lipoïque. L'enzyme possède un chromophore à fer-soufre dans le centre rédox qui intervient au niveau du flux d'électrons du pyruvate à la ferrédoxine.

Malgré cette instabilité, Uyeda et Rabinowitz (1971a) ont réussi à purifier la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase de *C. acidi-urici* et à préciser son mécanisme réactionnel (Uyeda et Rabinowitz, 1971b). Cette enzyme catalyse la réaction d'échange pyruvate-CO₂, l'oxydation du pyruvate avec la réduction d'accepteurs d'électrons variés et la formation d'acétoïne à partir

du pyruvate et de l'acétaldéhyde. Elle nécessite la présence de concentrations élevées en composés sulfhydryle pour une activité maximale. Le coenzyme A est nécessaire pour la réaction d'échange pyruvate-CO₂ mais à forte concentration il est inhibiteur. En effet, des études cinétiques ont montré que le coenzyme A diminuait le *K_m* apparent de la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase pour le CO₂ d'environ 5 fois alors que le *K_m* pour le pyruvate reste inchangé. La pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase de *C. acidi-urici* réduit la ferrédoxine, la rubrédoxine, le FAD et les accepteurs d'électrons artificiels, mais non les nucléotides à pyridine.

Plus récemment, la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase de *C. acetobutylicum* DSM 1731 a été également partiellement purifiée (Meinecke et coll., 1987). L'enzyme se présente sous forme d'un monomère de masse molaire 123 000 qui possède 0,39 moles de thiamine-pyrophosphate (TPP), 4,13 moles de fer et 2,91 moles de soufre par mole. Sa sensibilité à l'oxygène est très marquée, les valeurs de *K_m* de l'enzyme purifiée pour le pyruvate et le coenzyme A sont respectivement de 322 et 3,7 µM. Des concentrations élevées en CoASH (> 100 µM) ont un effet inhibiteur sur son activité.

IV.2.2. Activités enzymatiques impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA en butyryl-CoA.

Quatre enzymes participent à la voie métabolique de formation du butyryl-CoA à partir de l'acétyl-CoA : la thiolase, la β-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase, la crotonase et la butyryl-CoA déshydrogénase.

La thiolase (acétyl-CoA C-acétyltransférase, EC 2.3.1.9) de *C. acetobutylicum* ATCC 824 a été purifiée et étudiée par Wiesenborn et coll. (1988). Elle est composée de quatre sous-unités de masse molaire 44 000. Contrairement à la thiolase de *C. pasteurianum*, cette enzyme présente une activité élevée dans la gamme physiologique de pH intracellulaires compris entre 5,5 et 7,0, ce qui indique que la variation de pH intracellulaire n'est pas un facteur important de sa régulation. Pour la réaction de thiolase, les valeurs de *K_m* pour le coenzyme A et l'acétoacétyl-CoA sont respectivement de 4,7 et 32 µM. Lors de la réaction de condensation, la valeur de *K_m* pour l'acétyl-CoA est de 0,27 mM, des concentrations micromolaires de coenzyme A inhibent cette réaction. De même, le butyryl-CoA et l'ATP sont, eux aussi, inhibiteurs de la réaction de condensation et peuvent ainsi jouer un rôle de rétro-inhibiteurs. Un dernier facteur de régulation important est le rapport CoASH / acétyl-CoA car il peut intervenir sur la valeur du ratio des produits (C₃ + C₄) / C₂.

Waterson et coll. (1972) ont purifié et déterminé la composition en acides aminés de la crotonase (L-3-hydroxyacyl-CoA hydro-lyase, EC 4.2.1.17) de *C. acetobutylicum*. Celle-ci catalyse la réaction réversible d'hydratation du crotonyl-CoA. Elle est constituée de quatre sous-unités de masse molaire d'environ 40 000. L'enzyme possède des activités spécifiques très élevées dans le sens non physiologique et est spécifique des substrats enoyl-CoA de courtes chaînes. Seuls le crotonyl-CoA et l'hexenoyl-CoA ont pu être hydratés par l'enzyme pure, néanmoins, les extraits bruts catalysent l'hydratation des substrats enoyl-CoA avec un nombre de carbone supérieur, ce qui semble indiquer la présence de plusieurs hydratases dans la bactérie. L'enzyme présente des valeurs de K_m de 30 μ M pour le crotonyl-CoA et est très sensible à de fortes concentrations en crotonyl-CoA, aucune inhibition n'étant par contre observée avec l'hexenoyl-CoA.

La β -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase (L-3-hydroacyl-CoA : NAD⁺-oxydoréductase, EC 1.1.1.35) n'a pas encore été purifiée chez *C. butyricum*. Cependant, Youngleson et coll. (1989) ont cloné et séquencé chez *Escherichia coli* le gène *hbd* codant pour la β -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase de *C. acetobutylicum*. La séquence de l'enzyme est constituée de 282 acides aminés correspondant à une masse molaire de 31 435. L'enzyme synthétisée chez *E. coli* est spécifique du NADH, aucune activité NADPH-dépendante n'ayant été détectée.

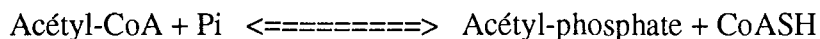
La butyryl-CoA déshydrogénase (butyryl-CoA : NAD⁺ oxydoréductase, EC 1.3.99.2) a été détectée chez *C. butylicum* et *C. kluyveri* (Hugo et coll., 1972). Hartmanis et Gatenbeck (1984) ont montré qu'il existait des niveaux très faibles de butyryl-CoA déshydrogénase chez *C. acetobutylicum*, aucune activité n'étant mesurée avec le NADH et le NADPH comme donneurs physiologiques d'électrons. D'après ces auteurs, la très grande sensibilité de cette enzyme à l'oxygène et l'inactivation de l'enzyme pendant la préparation de l'extrait acellulaire seraient à l'origine de ces résultats.

IV.3. La formation des acides. (Les phosphotransacylases et les kinases.)

Bien que les réactions terminales qui conduisent à la formation de l'acétate et du butyrate soient analogues, elles sont catalysées par des enzymes distinctes.

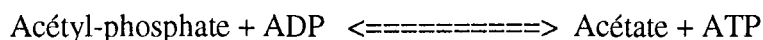
La présence d'une phosphotransacétylase et d'une acétate kinase a été suggérée chez toutes les bactéries anaérobies qui utilisent l'acétyl-CoA pour synthétiser de l'ATP (Thauer et coll. 1977).

La phosphotransacétylase (acétyl-CoA : orthophosphate acétyltransférase, EC 2.3.1.8) catalyse la réaction réversible :



Cette enzyme a été découverte chez *C. kluyveri* et partiellement purifiée et caractérisée par Stadtman (1952). Son pH optimal est compris entre 7,4 et 8,2 et la présence d'ions potassium ou ammonium et de composés sulfhydryl sont nécessaires pour une bonne activité de l'enzyme. La phosphotransacétylase de *C. thermoaceticum* a été isolée et partiellement caractérisée par Drake et coll. (1981). Elle est constituée de quatre sous-unités identiques de masse molaire 20 000. Son pH optimal est de 7,6 et son activité est stimulée de manière significative par le Mn^{2+} .

L'acétate kinase (ATP : acétate phosphotransférase, EC 2.7.2.1) catalyse la réaction suivante :



Elle a été isolée chez *C. acidi-urici* (Sagers et coll., 1961) et chez *C. thermoaceticum* (Schaupp et Ljungdall, 1974). L'acétate kinase de *C. acidi-urici* a un pH optimal de 6,7 et des constantes d'affinité pour l'acétyl-phosphate et l'ADP de 2,1 mM et 3,2 mM respectivement.

Chez *C. thermoaceticum*, l'enzyme a une masse molaire de 60 000 et sa valeur de K_m pour l'acétate est de 135 mM. L'activité de cette enzyme varie avec la quantité d'ATP selon une fonction sigmoïde; 1,64 mM d'ATP étant la concentration en ATP nécessaire à l'obtention de la moitié de l'activité maximale.

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

La présence d'une phosphotransbutyrylase (butyryl-CoA : orthophosphate butyryltransférase, EC 2.3.1.19) 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 264 000 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) 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 Mg^{2+} ou 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 85 000 et elle semble être constituée de deux sous-unités identiques. Le pH optimal de la réaction de formation du butyryl-phosphate est de 7,5 et la valeur de K_m pour le butyrate est de 14 mM.

Les deux gènes codant pour la phosphotransbutyrylase et la butyrate kinase de *C. acetobutylicum* ont été clonés chez *E. coli* (Cary et coll., 1988), d'après les résultats obtenus, ces auteurs suggèrent que les deux gènes forment un opéron.

Vasconcelos et coll. (1994) ont comparé les activités responsables de la synthèse des acides chez *C. acetobutylicum* dans deux cultures continues régulées à pH 6,5, sur glucose et sur un mélange de glucose et de glycérol. La diminution de la production des acides acétique et butyrique lorsque le glycérol est co-métabolisé est associée à une baisse des activités acétate et butyrate kinases ainsi que de la phosphotransbutyrylase et de la phosphotransacétylase. Cependant le ratio phosphotransbutyrylase / butyrate kinase (égal à 5) reste constant dans les deux cultures. D'après ces résultats, ces auteurs suggèrent d'une part qu'une induction plus faible ou une répression partielle de ces gènes aurait lieu dans la culture mixte et d'autre part qu'une concentration élevée en ATP régulerait, *in vivo*, les niveaux d'activités de ces quatre enzymes. Girbal (1994) montre que l'addition de pyruvate à une culture continue sur mélange glucose-glycérol entraîne une augmentation des activités phosphotransacétylase et acétate kinase d'un facteur 4 et 2 respectivement. Les activités de la phosphotransbutyrylase et de la butyrate kinase sont multipliées par 4 et 6. De plus une relation linéaire est trouvée entre les activités butyrate kinase et phosphotransbutyrylase et la concentration intracellulaire en ATP; une augmentation de cette dernière entraînant une diminution des activités enzymatiques. Ces résultats suggèrent fortement une régulation de l'expression des gènes de ces deux enzymes par l'ATP.

V. 1,3-PROPANEDIOL

Le 1,3-propanediol ou triméthylèneglycol est un liquide neutre, stable, visqueux, miscible à l'eau et aux alcools. Ce diol possède une densité de 1,06 et une température d'ébullition à la pression atmosphérique de 214 °C.

Jusqu'à maintenant, la production de 1,3-propanediol était réalisée par synthèse chimique par :

- hydrocarbonation d'oxyde d'éthylène
- hydratation d'acroléine en hydroxypropanal et réduction catalytique

Ces procédés coûteux mettent en œuvre des produits toxiques et génèrent un grand nombre de composés intermédiaires et secondaires non utilisables.

Des travaux préliminaires portent sur la production par fermentation du 1,3-propanediol en vue d'une application industrielle.

Les principaux domaines d'utilisation du 1,3-propanediol sont :

- additif dans la préparation de produits agro-alimentaires et pharmaceutiques.
- l'industrie du tabac
- produit de base pour la synthèse des polyuréthanes et des polyesters (Homann et coll., 1990; Witt et coll., 1994), qui se substitue avantageusement aux matières premières actuellement utilisées, comme l'éthylène glycol, le 1,2-propanediol et le 1,4-butanediol , grâce aux caractéristiques qu'il confère aux produits obtenus: résistance des fibres, élasticité, résistance à la lumière, à la corrosion (Witt et coll., 1994).

A présent, la biodégradabilité et les propriétés des polymères à base du 1,3-propanediol et des acides dioques sont sous investigation. Ces plastiques naturels devraient d'être beaucoup plus biodégradables que les plastiques synthétiques (Witt et coll., 1994; Deckwer, 1995). 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 13**).

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

- (i) Production d'un composé à haute valeur ajoutée
- (ii) Biodégradabilité des polymères dont la structure est basée sur le 1,3-propanediol.

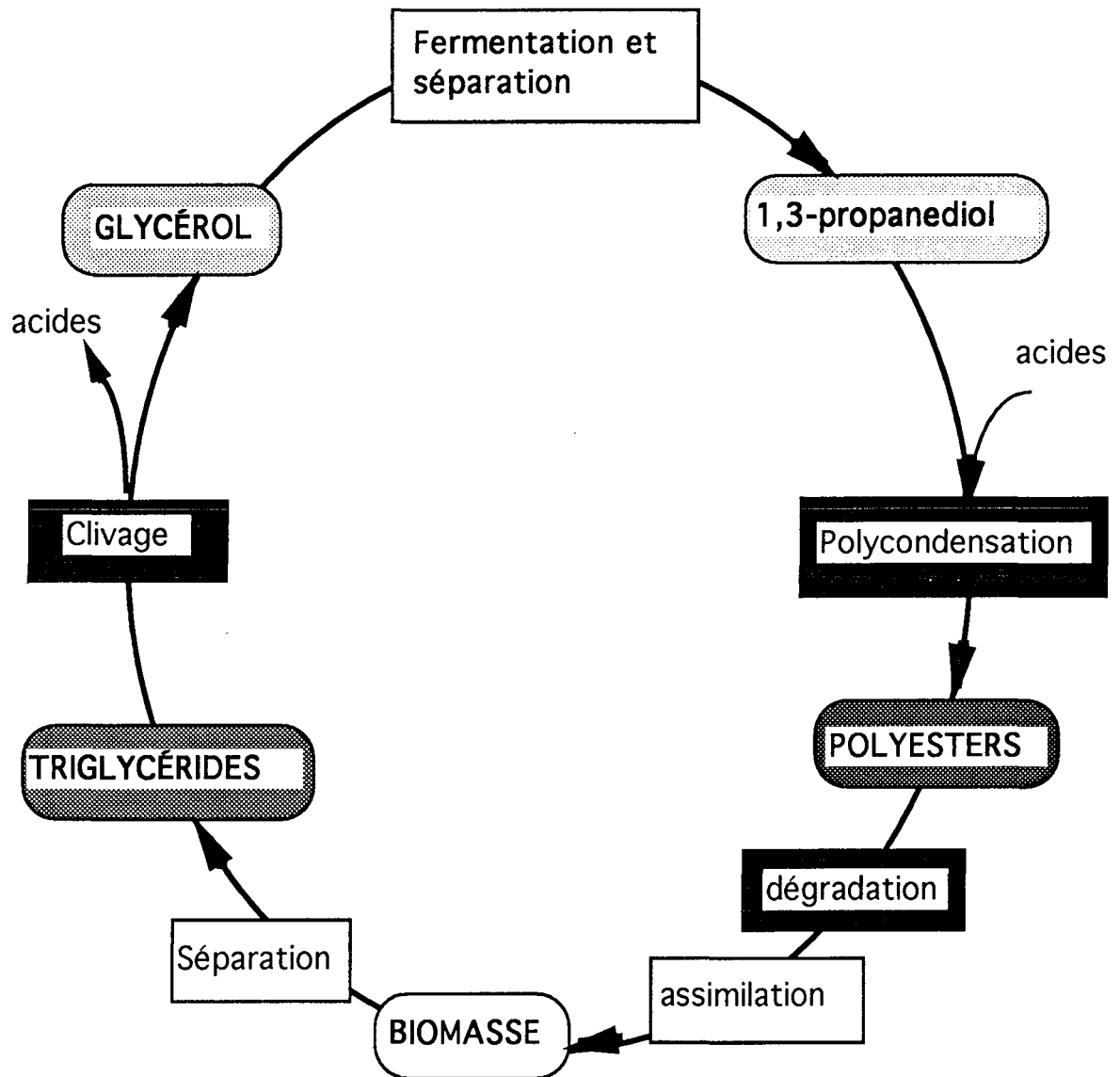


Figure 13. Inclusion des polymères biodégradables dans le cycle naturel (Witt et coll., 1994).

VI. APPROCHE DU TRAVAIL

Au cours de la première partie de ce travail, nous avons isolé de nouvelles souches de *Clostridium butyricum* à partir de niches écologiques favorables (résidus naturels riches en glycérol) pouvant se développer sur du glycérol provenant d'une unité de fabrication d'ester-carburant sans traitement préalable.

Nous avons ensuite essayé de déterminer les étapes limitantes du catabolisme anaérobie du glycérol par *Clostridium butyricum* DSM 5431 et en particulier étudié l'effet du flux de carbone et d'électrons sur le métabolisme du glucose et du glycérol en chemostat et en conditions de carbone limitant.

Pour l'amélioration de la production de 1,3-propanediol à partir du glycérol, tous les chercheurs étaient d'accord sur le fait qu'une souche qui ne dégagerait pas d'hydrogène moléculaire et qui ne produirait pas de butyrate, serait la souche idéale pour cette production; nous avons donc cherché à obtenir ces deux types de mutants à partir de la souche *Clostridium butyricum* DSM 5431 la plus étudiée et à partir de la souche *C. butyricum* E5 isolée au laboratoire :

* Les mutants du premier type, altérés dans la production de l'hydrogène, ont été obtenus à partir de *C. butyricum* DSM 5431 par mutagenèse à l'aide du N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NMNG) sélectionnés par culture en présence de fortes concentrations de mélange de bromure et de bromate (méthode appelée "proton suicide") qui permet de sélectionner des mutants dont les productions d'acides et d'hydrogène sont altérées.

* Les mutants du deuxième type, affectés dans la production de butyrate, ont été obtenus à partir de *C. butyricum* E5 par mutagenèse grâce au NMNG et sélectionnés par de fortes concentrations d'alcool allylique, cette résistance à l'alcool allylique conduit généralement à des mutants qui présentent une mutation au niveau des alcool déshydrogénases.

En dernier lieu, nous avons étudié l'effet d'un co-substrat, le glycéraldéhyde ou le propionaldéhyde, sur la fermentation du glycérol par *C. butyricum* en continu à un taux de dilution élevé.

MATÉRIELS
ET
MÉTHODES

Chapitre 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Souches utilisées

La souche bactérienne avec laquelle a été mené une partie importante de notre travail est *Clostridium butyricum* DSM 5431. Cette souche a été isolée par Biebl et coll. (1992) à partir d'échantillons de boue. Elle est conservée sous forme de spores en milieu liquide (RCM) à 4 °C. D'autres souches de *C. butyricum* isolées au laboratoire sont aussi utilisées.

Afin de disposer d'éléments de comparaison vis-à-vis du comportement fermentaire, la souche *C. pasteurianum* ATCC 6013 a également fait l'objet de cultures.

II. 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, le propionaldéhyde et le DL-glycéraldéhyde ont également servi de source carbonée selon l'étude.

II.1. Milieux de culture.

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

1- Glycérol	60 g pour les fermenteurs 20 g pour les tubes de précultures
K ₂ HPO ₄ , anhydre	1 g
KH ₂ PO ₄ , anhydre	0,5 g
Extrait de levure	1 g
solution SL7	2 ml
CaCO ₃	2 g (pour les tubes seulement)
2- (NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
MgSO ₄	200 mg
3- CaCl ₂	15 mg
4- FeSO ₄ , 7 H ₂ O	5 mg

Composition de la solution SL7, pour un litre :

ZnCl ₂	70 mg
MnCl ₂ , 4 H ₂ O	100 mg
BO ₃ H ₃	60 mg
CoCl ₂ , 2 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ , 2H ₂ O	20 mg
NiCl ₂ , 6 H ₂ O	25 mg
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ 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.

Ce milieu est également utilisé sous forme solide par addition de 15 g/l d'agar.

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

Pour nos besoins 10 g/l de glycérol y sont ajoutés.

Le milieu est porté à ébullition pour obtenir une dissolution parfaite et réduit sous flux d'azote.

Puis il est réparti en tubes de Hungate et stérilisé 15 minutes à 121 °C.

Milieu BHI (Brain Heart Infusion)

Ce milieu est obtenu sous forme déshydratée chez DIFCO et est reconstitué à raison de 37 g/l dans de l'eau distillée. La composition finale pour un litre est la suivante :

Infusion de Cerveau de veau	200 g
Infusion de Coeur de boeuf	250 g
Peptone	10 g
Glucose	2 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g

Le milieu est porté à ébullition pour obtenir une dissolution parfaite puis il est stérilisé 15 minutes à 121 °C.

II.2. 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.3. Milieu utilisé en cultures continues.

Pour les cultures continues en fermenteur, le milieu utilisé est celui décrit dans le paragraphe précédent, la concentration du glycérol utilisée est de 10 ou 40 g/l, celle du glucose est de 1; 3 ou 10 g/l et celle du propionaldéhyde et du DL-glycéraldéhyde varie entre 0 et 2 mM.

III. Conditions de Culture.

III. 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 obtenue sert à l'inoculation des tubes de préculture.

III. 2. Cultures en fermenteur.

III. 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 (20 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.

III. 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 ou 20 g/l de glucose 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.

IV.Méthodes analytiques.

IV.1. Détermination de la concentration cellulaire.

Deux méthodes ont été employées pour le suivi de la croissance cellulaire.

IV.1.1. Méthode spectrophotométrique.

La détermination de la densité cellulaire est effectuée par mesure de l'absorbance du milieu à une longueur d'onde de 600 nm par un spectrophotomètre Shimatzu UV160A. Une corrélation entre la densité optique et la matière sèche cellulaire a été établie. Ainsi la concentration cellulaire exprimée en g/l est proportionnelle selon un facteur de 0,3 à la densité optique.

IV.1.2. Matière sèche.

Un volume précis de suspension cellulaire est filtré au travers d'une membrane de micro-filtration de porosité 0,2 µm préalablement séchée et pesée. Après lavage à l'eau distillée et séchage à 105 °C pendant 24 h, la masse sèche est déterminée par différence de pesées.

IV.2. Dosage des Substrats.

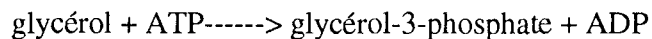
IV.2.1. Glucose.

La concentration en glucose dans le milieu est déterminée par l'hexokinase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase du kit Bœhringer.

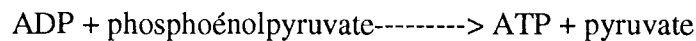
IV.2.2. Glycérol.

La concentration en glycérol est déterminée enzymatiquement en utilisant la glycérol kinase, la pyruvate kinase et la L-lactate déshydrogénase du kit Boehringer dont le principe est le suivant :

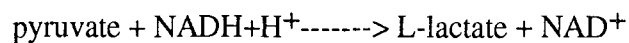
La glycérol kinase phosphoryle le glycérol, libérant de l' ADP :



Cet ADP est régénéré par la pyruvate kinase, ce qui donne du pyruvate :



Le pyruvate est réduit par la lactate déshydrogénase, libérant du NAD⁺ :



La quantité de NADH oxydé, stoechiométriquement identique à celle de glycérol, est déterminée par la diminution de la DO à 340 nm.

IV.2.3. Glycéraldéhyde.

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

A 500 µl 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-2-benzo thiazolinone hydrazone (MBTH, à 0,1%)

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

IV.3. Dosage des produits de fermentation

Les concentrations en 1,3-propanediol, en acétate et en butyrate sont déterminées par Chromatographie en phase gazeuse (Intersmat IGG 121 FL) avec une colonne de Chromosorb 101 d'une longueur de 2 m (diamètre interne:2mm) à une température de 170 °C. Elle est équipée d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un intégrateur Intersmat ICR 1B. L'azote est le gaz vecteur, (le gaz d'ionisation l'hydrogène mélangé à l'air comprimé) et l'étalon interne est le n-butanol.

IV.4. Détermination des concentrations intracellulaires en nucléotides.

La détermination des niveaux de nucléotides a été réalisée par dosages fluorimétriques des quantités de NADH formé ou consommé lors des réactions enzymatiques impliquant ces co-facteurs à l'aide des 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 essais ont été réalisés pour contrôler la récupération des nucléotides et la reproductibilité des méthodes d'extraction et de dosage.

IV.4.1. Dosage du NAD⁺ intracellulaire

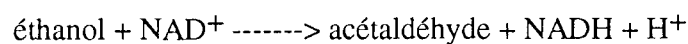
IV.4.1.1. Extraction

Le NAD⁺ est extrait avec l'acide chlorhydrique, le NADH et le NADPH étant détruits par ce traitement (Wimpenny et Firth, 1972).

A 4 ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance, est ajouté de l'acide chlorhydrique 3N jusqu'à pH 1,7. Après une incubation de 5 min à 50 °C, le pH est ramené à 7,0 par ajout de très faibles quantités de KOH 1N successives afin d'éviter la formation de concentrations locales trop élevées qui pourraient dégrader le NAD⁺. Une centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4 °C permet de récupérer la solution à doser.

IV.4.1.2. Dosage du NAD⁺ par fluorimétrie

Il s'agit de mesurer l'augmentation de fluorescence due à la réduction du NAD⁺ par l'alcool déshydrogénase NAD(H) spécifique (EC 1.1.1.1) de levure (Klingenberg, 1965; Vasconcelos et coll., 1994) selon la réaction :



Le milieu réactionnel de 1 ml contient (en concentrations finales) :

Tampon pyrophosphate (pH 8,8, additionné de 2,5 g/l de semicarbazide)	50 mM
Éthanol	100 mM
Extrait à doser	100 µl

la réaction est déclenchée par ajout de 10 U d'alcool déshydrogénase.

La fluorescence est mesurée avant et après l'addition de l'enzyme, la différence observée correspondant à la quantité de NAD⁺ réduit.

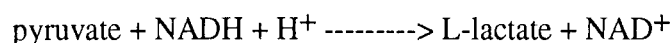
IV.4.2. Dosage du NADH intracellulaire

IV.2.1. Extraction

Le NADH est extrait avec l'hydroxyde de potassium, le NAD⁺ et le NADP⁺ présents dans le mélange sont ainsi détruits (Wimpenny et Firth, 1972). 4 ml de culture sont prélevés du bioréacteur et transférés rapidement dans un tube contenant du KOH 3N, qui servira ensuite à ajuster le pH à 12. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 12 000 g à 4 °C.

IV.2.2. Dosage du NADH par fluorimétrie

Ce dosage est suivi grâce à une diminution de fluorescence due à l'oxydation du NADH par la L-lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27) (Klingenberg, 1965) :



Le milieu réactionnel de 1ml contient (en concentrations finales) :

Tampon triéthanolamine, pH 6,0	100 mM
EDTA	3 mM
Pyruvate	2 mM

500 µl de l'extrait à doser

L'ajout de 10 U de lactate déshydrogénase initie la réaction.

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

IV.4.3. Dosage de l'acétyl-CoA

IV.4.3.1 Extraction

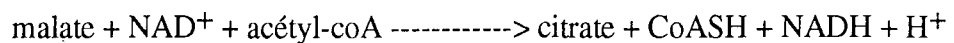
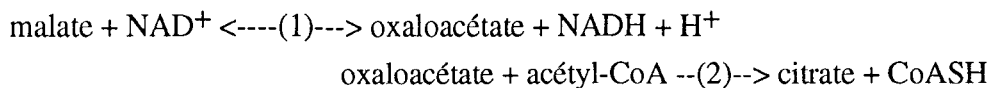
L'extraction est effectuée selon la méthode de Decker (1965). A un prélèvement de 4 ml de culture est ajouté un volume égal d'acide perchlorique (4 N). Après 3 minutes, la solution est neutralisée en deux étapes :

- par ajout de KOH (8N), sous agitation, jusqu'à pH 7,0 ;
- par ajout de KHCO₃ (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 servira au dosage.

IV.3.2. Dosage de l'acétyl-coenzyme A par photométrie

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 (en concentrations finales) 1M de tampon Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM de NAD, 1 M de L-malate et 1,65 ml d'extrait.

- la première DO, E₀, est alors lue à 340 nm.
- on ajoute 5 µl de malate déshydrogénase (EC 1.1.1.37) .
- quand l'équilibre de la réaction est atteint, on lit E₁.

5 µl de la citrate synthase (EC 4.1.3.7) sont ajoutés, et la DO E₂ est mesurée après déplacement de l'équilibre par la présence d'acétyl-CoA.

IV.5. Évaluation des activités enzymatiques

IV.5.1. Préparation des extraits acellulaires

Les cellules sont récupérées par centrifugation 25 minutes à 12 000 g, puis le culot est lavé dans le tampon Tris-HCl 50mM (pH 7,4) contenant 2 mM de dithiothréitol, préalablement réduit sous flux d'azote.

Après avoir été centrifugé 10 min à 12 000 g, le culot est suspendu dans le même tampon sous un flux d'azote.

Les cellules 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 disintegrator). Ce cycle est

répété quatre fois. Le surnageant est récupéré après une centrifugation de 15 min à 12 000 g, dégazé sous vide et le vide cassé à l'azote.

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

IV.5.2. Dosage des protéines

Le dosage colorimétrique de Bradford (1976) est utilisé. Cette méthode est basée sur le fait que l'absorbance maximum d'une solution acide de bleu de Coomassie passe de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu) après fixation sur les protéines.

Pour le dosage protéique des extraits acellulaires, le protocole adapté pour des concentrations de l'ordre de 0,2 à 1 mg/ml consiste en :

- 0,1 ml d'extrait acellulaire correctement dilué
- 5 ml de réactif (Bleu de Coomassie G250: 25 mg; Ethanol absolu : 12,5 ml; Acide orthophosphorique (85 %) : 25 ml; qsp 250 ml H₂O).

IV.5.3. Détermination des activités enzymatiques.

Glycérol déshydratase

Le dosage de la glycérol déshydratase (EC 4.2.1.30) est effectué par la méthode de Toraya et coll. (1977) .

Le milieu réactionnel contient (en concentrations finales) :

Tampon phosphate de potassium pH 7	35 mM
1,2-propanediol	200 mM
KCl	50 mM
coenzyme B ₁₂ (5'-dioxadénosyl-cobalamine)	15 µM

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

Après une incubation de 10 minutes à 34 °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%)

La réaction chimique entre le MBTH et l'aldéhyde formé s'effectue pendant 15 min à 34 °C elle est ensuite stoppée par ajout de 0,5 ml d'eau.

Puis les essais sont centrifugés à 12 000 g pendant 2 min.

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

Propanediol et glycérol déshydrogénases

Les activités de ces enzymes sont mesurées par augmentation linéaire de la densité optique à 340 nm due à la production du NADH (Ruch et coll., 1974).

Le milieu réactionnel (1 ml) contient :

Tampon bicarbonate de potassium pH 9	100 mM
NAD ⁺	2 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	30 mM
Glycérol ou propanediol	100 mM

Acétate et butyrate kinases

Toutes les autres activités enzymatiques sont dosées sous des conditions anaérobies à l'exception de la butyrate et l'acétate kinase.

Les activités acétate kinase (EC 2.7.2.1) et butyrate kinase (EC 2.7.2.7) sont déterminées en mesurant le taux d'acétyl-phosphate ou de butyryl-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 sodium	40 mM
Sulfate de manganèse	6 mM
ATP	10 mM.

La réaction est initiée par l'ajout d'extrait acellulaire. Après une incubation de 5 min à 37 °C, on ajoute du NH₂OH (700 mM, pH 6,4), neutralisé extemporanément avec NaOH 4 N.

Incubation pendant 5 min à température ambiante, puis ajout dans l'ordre, de TCA (15%), d'acide chlorhydrique (4 N) et de FeCl₃ (5%). Les essais sont centrifugés à 12 000 g pendant 5 min. Les DO des surnageants sont alors lues à 540 nm contre un blanc.

Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)

Le milieu réactionnel, de 1 ml, contient (Ferdinand, 1964) :

Tampon Ferdinand (KH ₂ PO ₄ 50 mM, EDTA 0,2 mM, triéthanolamine 40 mM, pH 8,9)	
D-glyceraldéhyde-3-phosphate	1 mM
NAD ⁺	1 mM.

La réaction enzymatique est déclenchée par addition de l'extrait acellulaire.

Afin de déterminer l'effet du rapport NADH / NAD⁺ sur l'activité de la GAPDH, le NAD⁺ à la concentration finale de 0,1 mM est utilisé dans le milieu réactionnel.

Hydrogénase

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

Tampon phosphate de potassium pH 7,2	60 mM
Méthyl viologène	20 mM

β -mercaptoéthanol	140 mM
Hydrogène	1 atm

La réaction enzymatique est déclenchée par addition de l'extrait acellulaire. La réduction du méthyl viologène est suivie à 560 nm.

Thiolase

La réaction de condensation de 2 molécules d'acétyl-CoA formant l'acétoacétyl-CoA et le CoASH est suivie en mesurant l'oxydation du NADH, couplée avec la réduction de l'acétoacétyl-CoA par la β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (Lynen et coll., 1952). Avec le système régénérateur de l'acétyl-phosphate, la phosphotransacétylase plus le CoASH, les activités sont déterminées en utilisant la méthode décrite Berndt et Schlegel (1975).

Le milieu réactionnel (1 ml) contient :

Tampon Tris-HCl pH 8.2	100 mM
CoASH	0.63 mM
Acétyl-phosphate	20 mM
Phosphotransacétylase (2 mg ml ⁻¹)	5 μ l.

Le mélange réactionnel est incubé pendant 10 min et la réaction est déclenchée par addition de :

NADH	0.30 mM
β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (2 mg ml ⁻¹)	5 μ l
Extrait acellulaire	10 μ l

NAD(P)H-ferrédoxine oxydoréductases.

Sens de réduction du NAD(P)⁺ :

Le réducteur de la ferrédoxine est le pyruvate. Le milieu réactionnel (1 ml) est dégazé sous flux de monoxyde de carbone (pour inhiber l'activité hydrogénase) et contient (Petitdemange et coll. 1976) :

Tampon Tris-HCl, pH 7,6	100 mM
CoASH	0,15 mM
NAD(P) ⁺	1,6 mM
FAD	25 μ M
Pyruvate de sodium	12 mM
KH ₂ AsO ₄	12 mM
Ferrédoxine	1 mM
CO	1 atm
Extrait acellulaire	

La réaction est déclenchée par l'apport du pyruvate et la réduction du NAD(P)⁺ est suivie à 340 nm.

Sens d'oxydation du NAD(P)H :

L'essai est basé sur la réduction non enzymatique du métronidazole [1-(2-hydroxyéthyl)-2-méthyl-5-nitroimidazole] par la ferrédoxine réduite, en présence d'acétyl-CoA (Blusson et coll., 1981). Le milieu réactionnel (1 ml) est dégazé sous flux de monoxyde de carbone et contient :

Tampon Tris-HCl, pH 7,6	100 mM
FAD	10 µM
Métronidazole	0,1 mM
Ferrédoxine	1 mM
Glutathion	2 mM

Système générateur d'acétyl-CoA

Acétyl-phosphate	20 mM
Phosphotransacétylase (PTA)	4 U
CoASH	1,6 mM

Système de régénération de NADH :

- NADH	250 µM
- Ethanol 96 %	30 µl
- Alcool déshydrogénase	45 U

Extrait acellulaire

La réaction est déclenchée par l'apport du système régénérateur de NADH et la réduction du métronidazole est suivie à 320 nm.

Réaction phosphoroclastique

Tampon phosphate, pH 6,5	25 mM
Pyruvate	1 mM
HSCoA	0,05 mM
Méthyl viologène	1 mM

* Dégazer les tubes à hémolyse, casser le vide sous azote puis ajouter l'extrait enzymatique (de 5 à 14 mg / ml de protéines). L'extrait est préparé dans du tampon phosphate de K⁺ avec ajout de DTT 20 mM.

* Incuber 10 minutes à 37 °C

* Ajouter

NaOH	3,5 N
Hydroxylamine-HCl	4 M

* Après 10 minutes ajouter

FeCl ₃	0,063 M
-------------------	---------

- Les deux dernières étapes se passent en aérobiose.

* Centrifuger puis lire la DO. à 540 nm contre un blanc.

V. Isolement de nouvelles souches de *Clostridium butyricum* aptes à fermenter le glycérol.

V.1. Isolement

Les boues anoxiques contenant des débris végétaux, provenant de la Moselle, de l'étang de Fontenoy et d'un canal asséché, sont suspendues dans du milieu Homann (20 g/l de glycérol). Afin de récupérer uniquement des bactéries sporulées, les tubes ensemencés sont soumis à un choc thermique de 10 minutes à 80 °C. Ces derniers sont incubés en anaérobiose à 34 °C.

Dès l'apparition d'une croissance et d'un dégagement gazeux, des repiquages successifs sont réalisés sur milieux Homann liquides et solides (15 g/l d'agar). Cette alternance permet d'isoler des souches pures à partir de cultures mixtes (différentes boues).

V.2. Tests effectués sur ces souches

Pour appartenir au genre *Clostridium*, les souches doivent être anaérobies strictes et sporulées. Toutes les souches isolées sont cultivées en anaérobiose (elles ne poussent pas en aérobiose), sont capables de sporuler et ne possèdent pas de catalase.

Pour vérifier l'appartenance à l'espèce *C. butyricum* les souches ont été testées sur galeries de sucres (20 sucres différents). Leurs profils fermentaires doivent être caractéristiques de l'espèce. De plus, l'ensemble des souches sélectionnées sont protéolyse, hémolyse, lipolyse et gélatinase négatives (Tableau voir résultats).

VI. Mutagenèse et sélection des mutants.

Afin de sélectionner différents types de mutants, une mutagenèse chimique sur une culture de *C. butyricum* en phase exponentielle permet d'obtenir des mutations de manière aléatoire puis différents modes de criblage ont été utilisés pour sélectionner les mutants recherchés.

VI.1. Mutagenèse en milieu liquide.

L'agent mutagène utilisé est le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NMNG) qui provoque des transitions de bases lors de la réplication du chromosome par alkylation.

Une culture en phase exponentielle de croissance est centrifugée 20 min à 3500 g et le culot est resuspendu dans du milieu de Homann sans source carbonée et incubé 2 h afin d'épuiser les réserves intracellulaires. L'agent mutagène est alors ajouté, à une concentration finale de 100 µg / ml (qui donne un pourcentage de survie de 1 %) et les cellules sont incubées

pendant 1 h à 34 °C en présence de cet agent mutagène. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans du milieu RCM et inoculées dans du milieu RCM supplémenté par 10 g/l de glycérol.

VI.2. Sélection de mutants résistants au substrat et produisant moins d'acides.

Lorsque la population est en phase exponentielle de croissance 40 g/l de 1,3-propanediol sont ajoutés dans le milieu de culture et l'incubation est poursuivie pendant 24 h à 34 °C afin de sélectionner des mutants de résistance au 1,3-propanediol. La sélection de mutants de *C. butyricum* qui produisent moins d'acide se fait ensuite par étalement de 100 µl de cette culture sur milieu solide BHI supplémenté par 8 g/l glucose (15 g/l agar) plus 175 mM de bromure de sodium et 175 mM de bromate de sodium et le pH du milieu est ajusté à 6,0 avec l'acide phosphorique. Les boîtes de Pétri sont incubées en anaérobiose à 34 °C pendant 48 à 72 h. Cette méthode, appelée "proton suicide", permet de sélectionner des mutants qui produisent moins d'acides; en effet en présence d'acide le bromure et le bromate donnent du brome qui est létal pour la bactérie, ce qui permet de sélectionner directement les mutants affectés dans la production des acides. Les mutants obtenus sont propagés dans du milieu RCM supplémenté avec 10 g/l de glycérol puis testés pour leur résistance au 1,3-propanediol et au glycérol et pour leur production d'acides. Les capacités fermentaires et les activités enzymatiques de ces mutants sont ensuite étudiées.

VI.3. Sélection des mutants résistants à l'alcool allylique.

La sélection des mutants se fait par étalement de la population mutagénisée comme précédemment (100 µl) sur boîtes de Pétri contenant du milieu de Homann solide (10 g/l glycérol). Des disques de papiers Whatman N° 1 de diamètre 9 mm inbibés par 50 à 100 µl d'alcool allylique sont placés à la surface de la boîte. Après 48 à 72 h d'incubation en anaérobiose à 34 °C, les colonies apparues dans la zone d'inhibition sont prélevées et repiquées sur milieu RCM + 10 g/l glycérol. Une deuxième sélection est effectuée sur le même milieu contenant des concentrations croissantes d'alcool allylique allant de 0,5 à 4 g/l. Les capacités fermentaires et les activités enzymatiques des mutants obtenus en présence de 3 g/l d'alcool allylique sont ensuite étudiées.

L'alcool allylique pourra être transformé par la 1,3-propanediol déshydrogénase en acroléine, qui est hautement toxique pour la bactérie, seules les cellules ayant perdu cette activité ou dont les propriétés enzymatiques seraient modifiées pourront alors survivre.

RESULTATS
ET
DISCUSSIONS

Chapitre 3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Partie 1. Isolement de nouvelles souches DE *C.BUTYICUM*.

I. RECHERCHE ET ÉTUDE DE NOUVELLES SOUCHES DE *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* APTES A FERMENTER LE GLYCÉROL ISSU D'UNE UNITÉ DE PRODUCTION DE "BIOCARBURANT".

I. 1. Introduction

La synthèse industrielle de biocarburant, dit "diesel vert", engendre un surplus d'un produit secondaire, le glycérol. Le but de cette étude est de valoriser ce glycérol en le transformant en produit à plus forte valeur ajoutée : le 1,3-propanediol grâce à une fermentation. Le 1,3-propanediol peut être utilisé dans l'industrie chimique comme solvant, additif et monomère pour la production de polyesters et de polyuréthanes.

Les souches de *Clostridium butyricum* décrites dans la littérature ont la capacité de fermenter le glycérol commercial en 1,3-propanediol avec des rendements élevés. L'étude de la croissance de 5 souches de collection (DSM 5431; ATCC 859; ATCC 19398; IP 10034; IP 3044) a donné les résultats attendus sur le glycérol commercial mais ces souches ont été incapables de se développer sur le glycérol issu d'une unité d'estérification d'huile de colza.

Devant ces résultats, de nouvelles souches ont été isolées. Les fermentations de 10 de ces souches sauvages de *C. butyricum* ont été suivies sur glycérol commercial et industriel. 2 souches donnent des résultats similaires sur les deux substrats, elles ont été retenues pour la suite du travail.

Provenance des souches sauvages.

F1 : Boues provenant du bord de la Moselle (en amont de Fontenoy).

F2 : Boues provenant de l'étang de Fontenoy.

F3: Boues provenant du bras mort de Fontenoy.

C : Boues provenant d'un canal asséché (Gondreville).

Le glycérol industriel obtenu de l'unité de trituration du colza est composé de :

- glycérol	650 g/l
- Na ₂ SO ₄	40 g/l
- Matière organique autre que glycérol	5 g/l
- Méthanol	1 g/l
- Impuretés variées	4 g/l

I.2. Résultats.

Les résultats concernant le travail d'isolement et de caractérisation des nouvelles souches de *C. butyricum* isolées au laboratoire sont présentés dans l'article intitulé : "**Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum***".



Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*

E Petitdemange, C Dürr, S Abbad Andaloussi and G Raval

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, BP 239, 54506, Vandoeuvre-les-Nancy, Cédex, France

Industrial glycerol obtained through the transesterification process using rapeseed oil did not support growth of several strains of *Clostridium butyricum* obtained from bacterial culture collections. Ten new strains of *C. butyricum* were obtained from mud samples from a river, a stagnant pond, and a dry canal. These new isolates fermented the commercial glycerol and produced 1,3-propanediol as a major fermentation product with concomitant production of acetic and butyric acids. Four of the ten isolates were able to grow on industrial glycerol obtained from rapeseed oil. One strain, *C. butyricum* E5, was very resistant to high levels of glycerol and 1,3-propanediol. Using fed-batch fermentation, 109 g L⁻¹ of industrial glycerol were converted into 58 g of 1,3-propanediol, 2.2 g of acetate and 6.1 g of butyrate per liter.

Keywords: *Clostridium butyricum*; glycerol; 1,3-propanediol

Introduction

Glycerol is a renewable resource found as a by-product of ethanolic fermentation of glucose or as a by-product of vegetable and animal fat processing. Many bacteria ferment glycerol into chemicals such as 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, ethanol, acetic acid and lactic acid [7,11,12].

The Enterobacteriaceae such as *Klebsiella* are glycerol users, but these bacteria are classified as opportunistic pathogens [6,11,13]. However, several *Clostridium* species grow on glycerol and form 1,3-propanediol, including the non-pathogenic *Clostridium butyricum* [2,7,9]. Industrial glycerols from various fat feed-stocks may differ considerably with regard to their microbial conversion rate, in particular glycerol obtained through the transesterification process using rapeseed oil. Indeed, it can be toxic and we found no growth of several strains of *Clostridium butyricum* from three bacterial culture collections. The purpose of this study was to isolate strains of *C. butyricum* able to utilize industrial glycerol obtained from rapeseed oil.

Materials and methods

Organisms

Ten new strains of *C. butyricum* were isolated in this study. Strains IP 10034 and IP 3044 were purchased from the Institut Pasteur Collection (Paris, France), ATCC 859 and ATCC 19398 from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), and DSM 5431 was kindly provided by H Biebl (Braunschweig, Germany).

Media and culture conditions

The strains were maintained on Reinforced Clostridial Medium (RCM, Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) in Hungate tubes (18 × 150 mm). This medium was also used supplemented with 10 g L⁻¹ glycerol as indicated in the text.

Precultures were performed in the medium described by H Biebl *et al.* [1] that contained per liter: glycerol (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France, Ref 24387), 20 g; K₂HPO₄, 1 g; KH₂PO₄, 0.5 g; (NH₄)₂SO₄, 2 g; MgSO₄·7H₂O, 0.2 g; CaCl₂·2H₂O, 15 mg; FeSO₄·7H₂O, 5 mg; CaCO₃, 2 g; yeast extract, 1 g; trace element solution SL7, 2 ml [3]. Precultures were grown in 100-ml screw-capped bottles with rubber septa for syringe operation: the bottles were filled with 50 ml preboiled medium and sealed under nitrogen before autoclaving them.

Batch fermentations were performed in a 2-L fermentor (LSL-Biolafitte, Saint-Germain en Laye, France) containing 1 L of growth medium, with the glycerol concentration at 50 g L⁻¹. 'Commercial glycerol' was furnished by Prolabo; 'industrial glycerol' obtained through a transesterification process using rapeseed oil (Robbe, Diester Industrie, Compiègne, France) was used without purification and consisted of (g L⁻¹): glycerol, 650; Na₂SO₄, 40; non-glycerol organic material, 5; methanol, 1; H₂O, 300; various impurities, eg heavy metals, organosolv lignin, 4. Temperature was maintained at 32° C, pH was controlled at 7.0 by the automatic addition of 2 M KOH, and with an agitation of 100 rpm; in this case CaCO₃ was omitted.

Fed-batch cultures were started with 50 g L⁻¹ glycerol, and after 20 h glycerol feeding (6 g L⁻¹ h⁻¹) was continuously added to the fermentor by a variable special pump (Gilson model Minipuls 2, Villiers-le-Bel, France).

Isolation procedure

Mud samples were collected from a river, a stagnant pond, and a dry canal. Enrichment cultures were inoculated with 4 ml of anoxic muds plus vegetable scraps. The crude inocula were heat shocked at 80° C for 10 min and incubated at 34° C without shaking. After 1-5 days, dense cultures

Correspondence: Dr E Petitdemange, Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, BP 239, 54506, Vandoeuvre-les-Nancy, Cédex, France

Received 8 February 1995; accepted 30 August 1995

Table I Characteristics of the isolates and comparison with reference strains of *C. butyricum*

Characteristics	New isolates										Reference strains		
	M1	M2	M3	E4	E5	F6	F7	F8	C10	C11	IP ^a 3044	IP ^a 10034	ATCC ^b 859
Indole produced	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch pH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolyzed	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin pH	+	w	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+
Esculin hydrolyzed	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecithinase produced	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipase produced	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin hydrolyzed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid from:													
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+
Erythritol	-	w	w	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	w	+	w	w	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	w	+	w	+	w	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitose	w	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Milk reaction	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
Hemolysin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aStrains tested in our laboratory

^b*C. butyricum* as described by Anaerobe Laboratory Manual [11]

Symbols: + = reaction positive or pH of sugars below 5.5; - = reaction negative; w = weak reactive or pH of sugars 5.5-5.9; c = curd (for milk); -+ = 11-39% of strains positive

that produced gas bubbles were selected for isolation of glycerol-fermenting anaerobic organisms on solid media (1.5% agar). Inoculated plates were incubated in an anaerobic jar (BBL, Cockeysville, MD, USA) for 1-2 days. The isolated colonies were transferred into liquid media and the procedure was repeated to assure the purity of the cultures, ie until the bacterial cells appeared microscopically homogeneous. The three media contained glycerol.

Biochemical characteristics and growth measurement

The media and methods of Holdeman *et al* [10] were used for the biochemical tests. Growth was measured by optical density at 650 nm with a spectrophotometer (Shimadzu UV 160A double beam, Kyoto, Japan).

Analytical methods

Glycerol was determined enzymatically using the Boehringer Mannheim test kit.

Cell culture supernatant samples were analyzed for the fermentation products 1-3 propanediol, and acetic and butyric acids by gas chromatography by injecting supernatant medium from centrifuged cultures (12000 x g for 15 min) into an Intersmat IGC 121FL gas chromatograph equipped with a flame ionization detector. The injector and

detector temperatures were 230°C. Separation took place in a 2-m (2-mm internal diameter) glass column packed with Chromosorb 101/80-100 mesh. Nitrogen was used as the carrier gas and *n*-butanol as internal standard. The column temperature was 170°C. The analysis of chromatographic data was carried out using an Intersmat ICR 1B Integrator (Delsi, Suresnes, France).

Glycerol and 1,3-propanediol tolerance

Growth inhibition was studied in Hungate tubes containing 9 ml RCM medium supplemented with glycerol (10 g L⁻¹), inoculated with 1 ml of cells in exponential phase and incubated at 34°C. A range of concentrations of glycerol or 1,3-propanediol were added except in the control tubes. The optical density at 650 nm was measured after 6 h in each tube. Inhibition (%) was determined from the following equation:

$$\frac{(OD_{c,t=6h} - OD_{c,t=0}) - (OD_{Ei,t=6h} - OD_{Ei,t=0})}{(OD_{c,t=6h} - OD_{c,t=0})} \times 100$$

where c = control tube and Ei = experiment (i = 1,2,...,x)

Table 2 Batch fermentation of 5.3% commercial glycerol by strains of *C. butyricum* from culture collections and by the ten new isolates

Clostridium strain	Glycerol used (g L ⁻¹)	Products formed (g L ⁻¹)			Butyrate	Conversion glycerol to 1,3 PD % (w/w)	Carbon recovery %
		Acetate	Butyrate	1,3-Propanediol	Acetate		
DSM 5431	48.8(1.6)	6.3(0.3)	1.3(0.1)	24.9(1.2)	0.2	51.0	87.1
IP 3044	47.0(1.5)	3.0(0.2)	4.2(0.3)	22.7(1.1)	1.4	48.0	87.0
ATCC 859	47.9(1.5)	3.3(0.2)	4.8(0.3)	22.0(1.1)	1.5	45.9	87.0
M1	49(1.8)	3.7(0.3)	4.6(0.2)	27.0(1.4)	1.2	55.0	98.0
M2	51.7(2.9)	4.2(0.3)	4.4(0.2)	26.3(1.3)	1	50.9	92.0
M3	48(1.7)	5.8(0.4)	2.2(0.1)	28.0(1.5)	0.4	58.0	99.0
E4	48.6(1.9)	2.8(0.2)	5.4(0.3)	24.8(1.2)	1.9	51.0	94.0
E5	52.6(2.1)	3.0(0.2)	5.5(0.4)	29.2(1.5)	1.8	55.5	97.7
F6	46.7(2.3)	3.2(0.3)	4.0(0.2)	23.4(1.2)	1.2	50.1	89.0
F7	48.3(1.6)	1.4(0.1)	5.8(0.3)	25.1(1.3)	4.1	52.0	92.5
F8	49.3(1.9)	3.5(0.2)	4.8(0.2)	28.1(1.4)	1.4	56.0	99.0
C10	53(1.9)	1.6(0.1)	6.7(0.4)	28.5(1.4)	4.2	55.0	96.0
C11	48.4(1.8)	1.5(0.1)	7.2(0.4)	25.0(2.2)	4.8	51.0	98.3

(): Standard deviation of three determinations

Table 3 Batch fermentation of 5.3% 'industrial' glycerol by four new isolates

Clostridium strain	Glycerol used (g L ⁻¹)	Products formed (g L ⁻¹)			Butyrate	Conversion glycerol to 1,3 PD % (w/w)	Carbon recovery %
		Acetate	Butyrate	1,3-Propanediol	Acetate		
M2	21.0 (1.3)	1.8 (0.2)	1.6 (0.2)	9.5 (0.6)	0.9	45.0	83.9
M3	53.0 (2.1)	3.0 (0.3)	5.5 (0.3)	25.0 (1.2)	1.8	47.0	87.5
E4	44.0 (2.1)	1.2 (0.1)	6.5 (0.4)	20.0 (1.1)	5.4	45.0	90.0
E5	53.0 (2.3)	2.2 (0.2)	6.1 (0.4)	27.0 (1.4)	2.8	51.0	92.0

Cultures were analyzed after 24 h of growth
(): Standard deviation of three determinations

Table 4 Fed-batch cultures by two new isolates^a

Strain	Type of glycerol	Glycerol used (g L ⁻¹)	Products formed (g L ⁻¹)			Butyrate	Conversion glycerol to 1,3 PD % (w/w)	Carbon recovery %
			Acetate	Butyrate	1,3 PD	Acetate		
E4	commercial	108 (2.5)	2.6 (0.2)	14 (0.8)	57.9 (2.5)	5.4	53.6	95
	industrial	96.0 (3)	1.4 (0.1)	13.8 (0.7)	50.3 (2.1)	9.8	47.4	95.7
E5	commercial	122 (3.5)	2 (0.15)	15.9 (0.8)	65.6 (3)	8	54.0	95
	industrial	109.2 (4)	1.6 (0.15)	14.6 (0.7)	58.4 (2.8)	9	53.5	95

^aThe initial concentration of 'commercial' or 'industrial' glycerol was 50 g L⁻¹, then after 20 h incubation glycerol feeding was realized at a constant rate of 6 g per h. The final fermentation volume was 1.3 L. Cultures were analyzed after 48 h of fermentation
(): Standard deviation of three determinations

Results

Isolation of ten new strains

The enrichment and selection procedures yielded pure cultures of ten obligately anaerobic, spore-forming, mesophilic and glycerol-fermenting bacteria. The cells were Gram-positive, rod-shaped with subterminal spores. The differential characteristics indicated that the isolates can be placed in the genus *Clostridium*, among the saccharolytic species. Using the test system of Holdeman *et al* [10] (Table 1), the ten isolates could be classified as *C. butyricum*; the strains were distinguished from *C. acetobutylicum* by their failure to liquefy gelatin, from *C. beijerinckii* by their ability to grow in a mineral medium (GMB) and from *C.*

pasteurianum due to their different pattern of use of carbon source utilization. The ten isolates proved to be identical in almost all characteristics.

Batch cultures

Fermentation of 'commercial' glycerol: The ten new isolates and the five strains from culture collections were screened for growth on glycerol (5.3%) and for synthesis of 1,3-propanediol. In our batch conditions, among the strains from collections, *C. butyricum* IP 10034 and ATCC 19398 did not grow on glycerol. As shown in Table 2, all other strains ie *C. butyricum* IP3044, ATCC 859, DSM

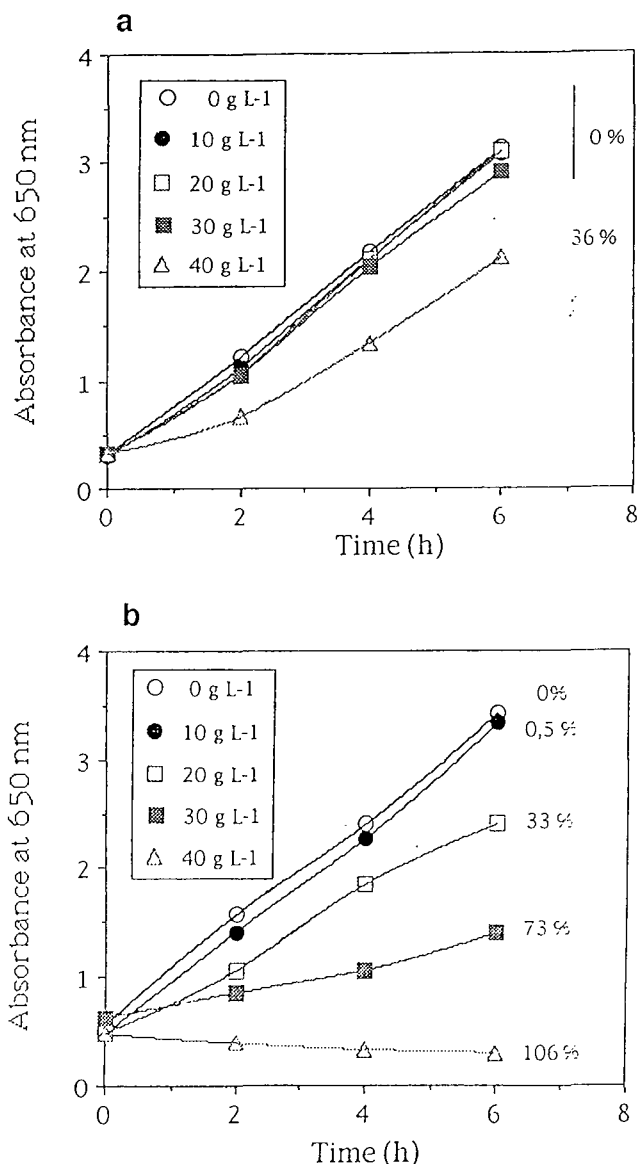


Figure 1 Effect of various concentrations of 1,3-propanediol on cellular growth. Cultures were incubated in Hungate culture tubes containing RCM medium supplemented with 10 g L⁻¹ glycerol. 0, 10, 20, 30, 40 g L⁻¹ refer to the concentration of the additional 1,3 propanediol. Percentages correspond to the inhibition rate. (a) = *C. butyricum* E5; (b) = *C. butyricum* DSM 5431

5431 as well as the ten new isolates almost completely fermented the glycerol and produced 1,3-propanediol as a major fermentation product with concomitant production of acetic and butyric acids. Carbon recoveries varied between 87–99%, and from 45 to 58% (w/w) of the glycerol was converted to 1,3-propanediol while the ratios of butyric acid/acetic acid were found in the range of 0.2 to 4.8. Concerning the butyrate/acetate ratios, three kinds of strains were found, those which produced (i) more acetate than butyrate (eg DSM 5431), (ii) the same quantities (eg M2), (iii) more butyrate than acetate (C11).

Fermentation of the 'industrial' glycerol: Strains obtained from bacterial culture collections were unable to grow on 'industrial' glycerol and, among the ten isolates,

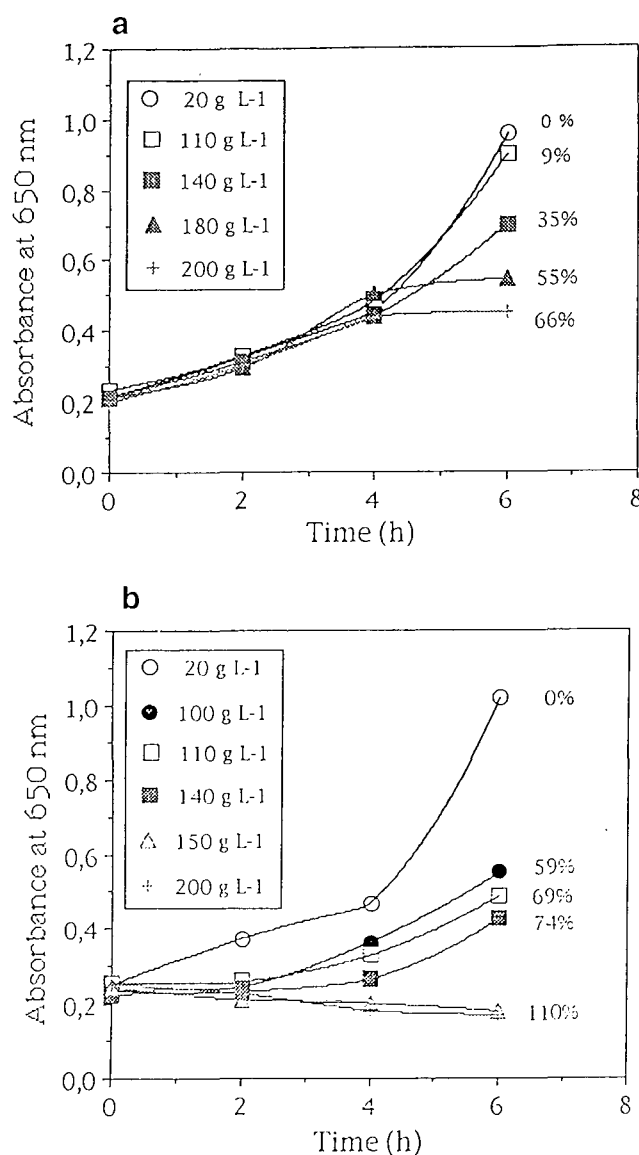


Figure 2 Effect of glycerol on cellular growth. Cultures were incubated in Hungate culture tubes in RCM medium. 20, 100, 110, 140, 150, 180, 200 g L⁻¹ refer to the concentration of the additional glycerol. Percentages correspond to the inhibition rate. (a) = *C. butyricum* E5; (b) = *C. butyricum* DSM 5431

only four strains grew on this carbon source (Table 3). Three strains of *Clostridium*, E4, M3, E5, efficiently used the industrial glycerol, especially the latter two strains. For these three strains industrial glycerol had a slight decrease in the percentage conversion into 1,3-propanediol. Moreover butyrate production increased for all strains.

Fed batch cultures

To alleviate the inhibitory effect of high glycerol concentrations, a fed-batch supply of glycerol was evaluated in order to lessen the inhibitory effects. As shown in Table 4, good production of 1,3-propanediol proceeded in fed batch cultures. For *Clostridium* strain E4, glycerol conversion (47.4%) on industrial glycerol was lower than that obtained on commercial glycerol (53.6%), but for *Clostridium* strain E5 the same values (53–54%) were obtained for both sub-

strates. The ratios of butyric acid/acetic acid were strongly influenced by the mode of glycerol supply: more butyric acid was produced in fed-batch (Table 4) than in batch fermentation (Table 3).

Inhibitory effects on growth of C. butyricum DSM 5431 and C. butyricum E5

Isolate *C. butyricum* E5 was far more resistant to inhibitory substances than the strains from culture collections. To evaluate the potential of *C. butyricum* E5 to survive at high concentrations of 'inhibitor', its growth was monitored in batch culture to which glycerol and 1,3-propanediol were added in increasing concentrations (Figures 1a and 2a). The performances of *C. butyricum* strain E5 were compared to the well known strain *C. butyricum* DSM 5431 (Figures 1b and 2b). 1,3-propanediol was more toxic for *Clostridium* DSM 5431 (Figure 1). At 40 g L⁻¹ of 1,3-propanediol the inhibition of growth for *Clostridium* E5 was 36%, whereas it was 106%, due to a total inhibition plus cell lysis, for *Clostridium* DSM 5431. At 200 g L⁻¹ of glycerol, growth was totally inhibited for *Clostridium* DSM 5431 while 66% inhibition was observed for *Clostridium* E-5 (Figure 2).

Discussion

A variety of strains of *C. butyricum* grew on purified glycerol (Table 2). Among five strains from culture collections and ten new isolates, only two strains failed to use this carbon source. If glycerol was used, the positive strains synthesized 1,3-propanediol as a major product with good yields and final 1,3-propanediol concentrations. Since the reduction of glycerol to 1,3-propanediol after dehydration to 3-hydroxypropionaldehyde produces no ATP, the concomitant formation of acetate and butyrate is needed [4]. Significant variations in the butyric acid/acetic acid ratios were observed depending on the strains used, suggesting different regulatory mechanisms of the redox equilibrium state at the level of the ferredoxin oxidoreductase activities and the hydrogenase [4,9].

Glycerol produced by cleavage of natural fats can be converted by microorganisms to 1,3-propanediol without further purification [5]. However, industrial glycerol obtained through the transesterification process leads to a toxic substrate, which cannot be used by any of the *C. butyricum* strains from culture collections we tested. Product inhibition in the clostridial glycerol fermentation is much more an effect of 1,3-propanediol than of butyric and acetic acid—although the latter are more toxic to the microorganisms—but occurs at concentrations too low to affect the cells appreciably [14]. Inhibition by individual products has been determined in *Clostridium butyricum* E5 and also *C. butyricum* DSM-5431 which is well known [1,2,5,8] and hence which we used as a representative strain. The results obtained showed clearly a greater

resistance for the new isolate which was able, in fed-batch fermentation, to convert 109 g L⁻¹ of raw glycerol into 58 g of 1,3-propanediol, whereas the *Clostridium* DSM strain converted 108 g of purified glycerol into 55 g of 1,3-propanediol [8].

Acknowledgements

This work was supported by the French 'Ministère de l'Agriculture et de la Pêche', contract no. R.94-06 and by a fellowship to CD from the SICA-EPILOR. We thank E McRae for critical reading of the manuscript.

References

- 1 Biebl H. 1991. Glycerol fermentation to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of pH-auxostat. *Appl Microbiol Biotechnol* 35: 701-705.
- 2 Biebl H, S Marten, H Hippe and W-D Deckwer. 1992. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 592-597.
- 3 Biebl H and N Pfenning. 1981. Isolation of members of the family Rhodospirillaceae. In: *The Prokaryotes* (Starr MP, H Stolp, HG Trüper, A Balows and HG Schlegel, eds), pp 267-273. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- 4 Dabrock B, H Bahl and G Gottschalk. 1992. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl Environ Microbiol* 58: 1233-1239.
- 5 Deckwer W-D, B Günzel, H Biebl, RJ Müller and FJ Carduek. 1992. Glycerol conversion to 1,3-propanediol, a versatile component for biodegradable plastics. In: *Biomass for Energy and Industry* (Hall DO, G Grassi and H Scheer, eds), pp 326-331, Elsevier Applied Science, London and New York.
- 6 Forage RG and MA Foster. 1982. Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B₁₂-dependent glycerol and diol dehydratases. *J Bacteriol* 149: 413-419.
- 7 Forsberg CW. 1987. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. *Appl Environ Microbiol* 53: 639-643.
- 8 Günzel B, S Yonsel and W-D Deckwer. 1991. Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to scale of 2 m³. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 289-294.
- 9 Heyndrickx M, P de Vos, M Vancanneyt and J de Ley. 1991. The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212 t₂ and 1213 t₁ and *C. pasteurianum* LMG 3285. *Appl Microbiol Biotechnol* 34: 637-642.
- 10 Holdeman LV and WEC Moore. 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*. Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, VA.
- 11 Homann T, C Tag, H Biebl, W-D Deckwer and B Schink. 1990. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 33: 121-126.
- 12 Schütz H and F Radler. 1984. Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1,3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Syst Appl Microbiol* 5: 169-178.
- 13 Streekstra H, MJ Teixeira de Mattos, OM Neijssel and DW Tempest. 1987. Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in Chemostat culture. *Arch Microbiol* 147: 268-275.
- 14 Zeng AP, A Ross, H Biebl, C Tag, B Günzel and W-D Deckwer 1994. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnol Bioeng* 44: 902-911.

I.3. Conclusion.

Au cours de ce travail, nous avons isolé des souches de *Clostridium butyricum* capables de fermenter du glycérol obtenu à partir d'une unité de fabrication d'ester carburant, bien que ce glycérol soit particulièrement toxique, puisque les souches de collection étudiées sont totalement inhibées.

Deux des souches isolées 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 le glycérol pur. Ces caractéristiques sont nettement supérieures à celles des souches décrites dans la littérature.

Les résultats obtenus dans cet article montrent clairement que ces deux souches sont très résistantes à de très fortes concentrations de glycérol et 1,3-propanediol puisqu'à des 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 résultats des fermentations du glycérol commercial et industriel en fed-batch par les souches *C. butyricum* E4 et *C. butyricum* E5 montrent que ces deux souches produisent beaucoup plus d'acide butyrique que d'acide acétique que lors des cultures batch et que les meilleurs taux de bioconversion du glycérol en 1,3-propanediol sont obtenus par la souche *C. butyricum* E5 et ceci quelle que soit la provenance du glycérol.

Partie 2. Caractérisation de la fermentation du glycérol par *C. butyricum*

II. ÉTUDE DU FLUX CARBONÉ CHEZ *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* CULTIVÉ EN CULTURE CONTINUE SUR GLYCÉROL ET SUR GLUCOSE.

II.1. Introduction

C. butyricum est un micro-organisme capable de dégrader de nombreuses sources de carbone. Les produits de la fermentation du glucose par ce micro-organisme sont constitués d'acide acétique, d'acide butyrique, de CO₂ et d'hydrogène. Si le glycérol est présent dans le milieu de culture le produit majoritaire est le 1,3-propanediol.

La fermentation du glucose et du glycérol par *C. butyricum* a été très étudiée par de nombreux chercheurs mais les activités enzymatiques et les régulations de ces fermentations n'ont jamais été étudiées. Nous avons utilisé la culture en continu afin d'étudier dans des conditions parfaitement définies les voies métaboliques intervenant dans la fermentation du glucose et du glycérol pour déterminer :

- * les mécanismes de cette fermentation
- * les étapes limitantes de cette fermentation.

II.2. Résultats

Les résultats des expériences de l'étude du flux carboné chez *C. butyricum* cultivé en chemostat sur glycérol et sur glucose sont présentés dans l'article intitulé : "**Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose**".

MICROBIOLOGY 1996, **142**, 1149-1158.

CARBON AND ELECTRON FLOW IN *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* GROWN IN
CHEMOSTAT CULTURE ON GLYCEROL AND ON GLUCOSE

Running title: Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium butyricum*.

Keywords: *Clostridium butyricum*, glycerol catabolism, glucose catabolism, carbon flow,
electron flow.

Subject category: Physiology and growth.

Abbad-Andaloussi S., C. Dürr, G. Raval, and H. Petitdemange*.

Laboratoire de chimie Biologique I,
Université Henri POINCARÉ, Nancy I,
B. P. 239,
54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex
France
Tel. : 83-91-20-53
Fax. : 83-91-25-50

* Corresponding author

SUMMARY.

The metabolism of *Clostridium butyricum* DSM 5431 was studied in chemostat culture under carbon limitation using either glucose or glycerol. On glycerol, the enzymes glycerol dehydrogenase, diol dehydratase and 1,3-PD dehydrogenase constitute the branch point that partition the carbon flux between the competing pathways, i.e. formation of either 1,3-PD or acetate and butyrate. The increasing levels of these enzyme activities with increasing dilution rates (D) explained the constant proportion of glycerol conversion into 1,3-PD.

The production of acetate or butyrate constitutes another important branch point and when D increased (i) large amounts of intracellular acetyl-CoA accumulated, (ii) the carbon flux switched from butyric acid to acetic acid, (iii) the specific activity of thiolase was not affected, suggesting this enzyme may be the bottleneck for carbon flux to butyrate biosynthesis providing an explanation for accumulation of large amounts of intracellular acetyl-CoA, (iv) high levels of NADH were found in the cell. Oxidation of NADH by the 1,3-PD dehydrogenase was linked to the production of 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) by glycerol dehydratase. The fact that high intracellular concentrations of NADH were found means that diol dehydratase activity is the rate-limiting step in 1,3-PD formation, avoiding the accumulation of 3-HPA which is a very toxic compound.

The specific rate of glucose catabolism ($q_{\text{glu}} = 11.1 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) was around four times lower than the specific rate of glycerol catabolism ($q_{\text{gly}} = 57.4 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). On glucose-grown cells, reducing equivalents which are released in the glycolytic pathway were reoxidized by the butyric pathway and the low specific formation rate of butyric acid led to an increase in the intracellular level of acetyl-CoA and NADH. Carbon flow was higher on glycerol due to the reoxidation of NADH by both butyric and PD pathways.

INTRODUCTION.

Over the past years there has been an increase in research and development efforts involving clostridial fermentations, namely the fermentation of glucose by butyric acid bacteria (Woods, 1993). Clostridia are able to ferment the carbon source to a variety of end products by means of branched fermentation pathways. Generally, the different branches of the fermentation are not equivalent with respect to the generation of energy or reducing equivalents, and the amount of reduced versus neutral and oxidized products has the potential for a great deal of natural variation. It was shown (Jungermann *et al.*, 1973; Petitmange *et al.*, 1976) that the reduced electron carrier ferredoxin (fd) plays a pivotal role in electron distribution in the cell in that it can either transfer electrons via hydrogenase to generate hydrogen or transfer the electrons to the pyridine nucleotides via the appropriate fd oxidoreductase. The activities of three enzymes, NADH-fd oxidoreductase, NADPH-fd oxidoreductase and hydrogenase are responsible for controlling the electron flow, which in turn determines the carbon flow within the cell.

Clostridium butyricum is known as a classical acid producer and usually ferments carbohydrates to butyrate, acetate, carbon dioxide and molecular hydrogen. Usually about 2 mol of CO₂ and 2.5 mol of H₂ are produced per mole hexose catabolized (Jungermann *et al.*, 1973). The production of acetate or butyrate constitutes an important branch point (Fig. 1). *C. butyricum* is also able to catabolize glycerol and an additional branch point of fermentation exists (Fig. 1) : glycerol can be either oxidized to dihydroxyacetone (DHA) and subsequently phosphorylated to yield DHAP, or it can be dehydrated to 3-HPA. The latter compound is then reduced to 1,3-PD. Fermentative utilization of glycerol, a more reduced substrate than glucose, requires the disposal of the two extra hydrogen atoms; this could be accomplished by stimulating H₂ production. Surprisingly, the reducing power is not used to form H₂, but a more reduced compound, 1,3-PD. The concentrations of the fermentation end-products have been extensively studied in *C. butyricum* (Biebl, 1991; Biebl *et al.*, 1992; Günzel, 1991; Günzel *et al.*, 1991; Heyndrickx *et al.*, 1991b); in all fermentations the yield of 1,3-PD in relation to glycerol was higher than expected from NADH production by acid formation. In contrast, H₂ production was lower than expected, if it is assumed that one one mol H₂ is released per mol acetyl-CoA formed. So nothing is known about how the oxidation/reduction

state is balanced during glycerol catabolism. Also, very little is known regarding the regulation of the acetate/butyrate ratio when *C. butyricum* is growing on glucose, except that the excess H₂ is formed by NADH-fd reductase activity to balance the amount of acetate made (Jungermann *et al.*, 1973).

From the scheme shown in Fig. 1, it is interesting to note that when glycerol and glucose are used for the the growth of *C. butyricum*, the carbon metabolism pathway going from glyceraldehyde-3-phosphate to pyruvate is the same but there is a different distribution of the electron flow since during glucose fermentation more H₂ is produced than CO₂ (Jungermann *et al.*, 1973), whereas glycerol fermentation yields considerably less H₂ than CO₂ (Biebl *et al.*,1992). This is why in the present paper, we deal with the metabolic aspect of *C. butyricum* when grown on glucose or glycerol, using continuous culture, an obvious tool to unravel metabolic regulation. Furthermore, to understand the observed changes in the metabolism in the steady-state chemostat culture, the level of the key enzymatic activities and the NAD⁺, NADH and acetyl-CoA pools were analysed. *C. butyricum* DSM 5431 was chosen for this study because it has been used in several investigations relating to the various events which take place during glycerol metabolism (Biebl, 1991; Biebl *et al.*,1992; Günzel, 1991; Günzel *et al.*, 1991).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals were reagent grade. Enzymes and coenzymes were obtained from Sigma. All gases used were purchased from Air Liquide.

Organism and medium. *C. butyricum* DSM 5431 was used. The spores of the strain were stored at 4 °C in RCM medium (**R**einforced **C**lostridial **M**edium purchased from Oxoid). *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 was grown in the same medium as *C. butyricum* but with glucose as carbon source.

The preculture medium contained the following components (l distilled H₂O)⁻¹ : glycerol, 20 g; K₂HPO₄, 1.0 g; KH₂PO₄, 0.5 g; (NH₄)₂SO₄, 2.0 g; MgSO₄ · 7 H₂O, 0.2 g; CaCl₂ · 2 H₂O, 15 mg; FeSO₄ · 7 H₂O, 5 mg; CaCO₃, 2.0 g; yeast extract, 1.0 g; trace element solution SL7 (Biebl & Pfenning, 1982), 2 ml. The growth temperature was 32 °C.

Fermentation modes. *Continuous cultures* were carried out aseptically in a 2-L bioreactor (LSL-Biolafitte, 2-L growth vessel with a 1-L working volume). The temperature was controlled at 32°C and pH was controlled at 7 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 liter by automatic regulation of the culture level. The bioreactor was inoculated (10 %, v/v) with exponential preculture. The culture was grown in batches for 12 h before the medium flow was started at a low dilution rate (D). Two substrates were used in this study, glycerol at concentration 10 g.l⁻¹ and glucose at 1, 3 and 10 g.l⁻¹.

Analytical methods. Glycerol was determined enzymatically via glycerol kinase, pyruvate kinase and L-lactate dehydrogenase using the Bœhringer test kit and instructions. Glucose was assayed with hexokinase and glucose-6-P dehydrogenase using the Bœhringer diagnostic kit. Concentrations of 1,3-PD, 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 x 2 mm i.d.) packed with chromosorb 101/80-100 mesh. Nitrogen was used as the carrier gas and n-butanol as the internal standard and the temperature of the column was 170 °C. Data were analysed with an Intersmat ICR IB Integrator.

The cell concentrations were estimated by cell dry weight measurement using a predetermined correlation between A_{650} (Shimatzu UV160A double beam spectrophotometer) and cell dry weight.

Preparation of cell free extracts. Cells were centrifuged at 12,000 x g for 15 min; after washing with Tris buffer (50 mM Tris/HCl; 2.0 mM DTT; 0.1 mM $MnSO_4$; pH 7.4) cells were resuspended in this buffer. The cells were sonicated at 2 °C four times for 20 s at a frequency of 20 kcycles s^{-1} , separated by 60 s (MSE, 150 watt ultrasonic disintegrator). The supernatant was collected from the cell lysate following centrifugation at 12,000 x g for 20 min at 4 °C. At each step, extracts were maintained under anaerobic conditions. To measure hydrogenase activity, cell free extract was prepared as described but without washing.

Protein concentrations of cell extracts were determined according to the Bradford (1976) method, using crystalline bovine serum albumin as the standard.

Enzyme assays.

Hydrogenase (EC 1.12.7.1) in the direction of methyl viologen reduction was assayed as described by Junelles *et al.* (1988), modified as follows : 60 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2); 20 mM methyl viologen; 140 mM β -mercaptoethanol under a hydrogen atmosphere.

Fd-NAD⁺ reductase was assayed with pyruvate as the reductant of fd and under a carbon monoxide atmosphere according to Petitdemange *et al.* (1976), modified by the addition of 1 mM purified fd (Sigma).

NADH-fd reductase was measured by the metronidazole reduction according to the method of Blusson *et al.* (1981).

Glycerol dehydrogenase (EC 1.1.1.6) and 1,3-PD dehydrogenase (EC 1.1.1.202) activities were measured by the linear increase in A_{340} produced by addition of cell extracts (Ruch *et al.*, 1974). The assays contained the following components: 100 mM glycerol or 1,3-PD; 2 mM NAD^+ ; 30 mM ammonium sulfate, and 100 mM potassium carbonate buffer (pH 9.0).

Diol dehydratase (PD 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 PD; 0.05 M KCl; 0.035 M potassium

phosphate buffer (pH 7.0); 15 μ M adenosylcobalamin and an appropriate amount of cell extract in a total volume of 1 ml. After incubation at 37 °C for 10 min, the enzyme reaction was stopped by adding 1 ml of 0.1 M potassium citrate buffer (pH 3.6) and 0.5 ml of 0.1 % MBTH hydrochloride. After 15 min at 37 °C, 1 ml of water was added and the amount of propionaldehyde was determined from A_{305} . The apparent molar extinction coefficient at 305 nm for the coloured product formed from propionaldehyde in the MBTH method was $13.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Acetate kinase (EC 2.7.2.1) and Butyrate kinase (EC 2.7.2.7). The enzymatic activities were determined by the analytical procedure for acetyl-phosphate (Lipmann & Tuttle, 1945). Enzyme activities were assayed in a volume of 0.8 ml containing (mmol): Tris-HCl buffer (pH 7.5), 40; potassium acetate or potassium butyrate, 160; manganese sulfate, 2.4; ATP, 4. The reaction was initiated by addition of crude extract. After 5 min at 37 °C, 0.2 ml of hydroxylamine (2.1 M) pH 6.4 (freshly neutralized) was added. After 5 min at room temperature, the reaction was stopped by addition of 0.2 ml TCA (15%), 0.2 ml HCl (4 M) and 0.2 ml FeCl_3 (5% w/v in HCl 0.1 N). The amounts of acetyl hydroxamate or butyryl hydroxamate formed were determined at 540 nm by using a standard curve obtained with purified acetate kinase, since acetyl hydroxamate and butyryl hydroxamate have identical extinction coefficients (Lipmann & Tuttle, 1945).

Phosphoroclastic activities. Assays were based on ability to catalyse formation of acetyl phosphate in pyruvate oxidation as previously described by Mortenson *et al.* (1963), modified as follows : 25 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5); 1 mM sodium pyruvate; 0.05 mM CoenzymeA; 1 mM methyl viologen.

Thiolase. The condensation reaction of two molecules of acetyl-CoA forming acetoacetyl-CoA and CoASH was followed by measuring the oxidation of NADH, coupled with the reduction of acetoacetyl-CoA by β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (Lynen *et al.*, 1952). With the regenerating system acetyl-phosphate and phosphotransacetylase plus CoASH, activities were determined as previously described by Berndt & Schlegel (1975). A cuvette contained: 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.2; 0.63 mM CoASH; 20 mM acetyl-phosphate and 5 μ l of phosphotransacetylase (2 mg ml^{-1}). The mixture was incubated for 10 min, then the

reaction was started by adding 0.30 mM NADH, 5 ml of β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (2 mg ml⁻¹) and 10 μ l of cell extract.

Determination of NAD⁺ and NADH pools. Levels of NAD⁺, NADH and acetyl-CoA were measured after extraction of a culture broth sample, neutralization and filtration. Samples of 4 ml were taken quickly from the bioreactor with sterile syringes and immediately put into tubes containing the extractant, without separating the cells from the medium. NAD⁺ was extracted with HCl (NADH and NADPH were degraded), and NADH was extracted with KOH (degrading NAD⁺ and NADP⁺) as described by Wimpenny & Firth (1972). Before assays for NADH, this coenzyme was converted to NAD⁺ with lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.28) (Klingenberg, 1965). NAD⁺ was assayed with a NAD(H)-specific alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) (Klingenberg, 1965; Vasconcelos *et al.*, 1994) and the resulting NADH was determined by fluorometry (Hitachi, Tokyo, Japon; model F-2000) and by spectrophotometry.

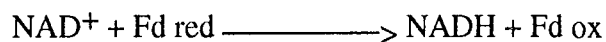
Determination of intracellular acetyl-CoA. Acetyl-CoA was extracted with perchloric acid as described by Decker (1965). The level of acetyl-CoA was determined by a method described by Tubbs & Garland (1969) using citrate synthase (EC 4.1.3.7) and malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37). The citrate synthase consumes oxaloacetate and acetyl-CoA, and so displaces the equilibrium of the reaction catalysed by malate dehydrogenase; thus acetyl-CoA removal causes the formation of NADH₂, which may be measured spectrophotometrically. All enzyme assays, except acetate and butyrate kinase, were performed under anaerobic conditions. Each enzyme assay was done in duplicate on three extracts. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyses the conversion of 1 μ mol substrate min⁻¹.

Calculations : The main products of glycerol fermentation by *C. butyricum* were 1,3-PD, butyrate and acetate (Biebl *et al.*, 1991) (see Fig.1). The minimum or maximum amount of NADH formed can be calculated according to the equations of glycerol conversion to acetate and butyrate :

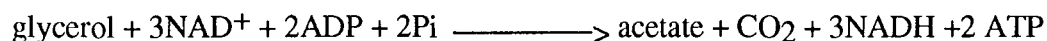


NADH is formed by glycerol dehydrogenase and glyceraldehyde-3-P dehydrogenase. ATP is formed by phosphoglycerate kinase, pyruvate kinase and acetate kinase, whereas dihydroxyacetone kinase uses one ATP.

If reduced fd is not reoxidized by hydrogenase but is entirely reoxidized by the fd-NAD⁺ reductase according to :



the conversion of glycerol to acetate becomes :



The minimum amount of NADH formed via the acetate pathway is 2 and the maximum NADH is 3, hence the corresponding production of 1,3-PD must be between 2 and 3 moles.

Conversion of glycerol to butyrate can be written as :



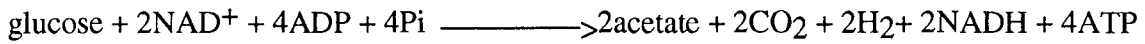
On the assumption that the reduced fd is entirely reoxidized by the fd-NAD⁺ reductase activity rather than being released as molecular H₂ via hydrogenase, the conversion of glycerol to butyrate becomes :



NADH results from the production of two moles by glycerol dehydrogenase and two moles by glyceraldehyde-3P dehydrogenase, whereas two moles are used by 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase and butyryl-CoA dehydrogenase.

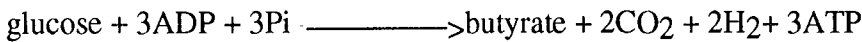
The minimum amount of NADH formed via the butyrate pathway is 2 and the maximum NADH is 4, hence the corresponding production of 1,3-PD must be between 2 and 4 moles.

In glucose catabolism the acetate formation can be written :



ATP is formed by phosphoglycerate kinase, pyruvate kinase and acetate kinase. The minimum amount of NADH formed via the acetate pathway is 2 NADH produced by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the maximum amount is 4 on the assumption that the reduced fd is entirely reoxidized by the fd-NAD⁺ reductase activity.

Glucose conversion to butyrate can be written :



ATP is formed by phosphoglycerate kinase, pyruvate kinase and butyrate kinase. The formation of butyrate is redox neutral since the 2 NADH produced by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase are used in butyrate biosynthesis, but the maximum NADH is 2 if the reduced fd is entirely reoxidized by the fd -NAD⁺ reductase.

Specific rate calculations with glycerol as substrate:

The specific rate of pyruvate formation was calculated as follows:

$$q_{\text{gly}} - q_{\text{PD}} = q_{\text{pyr}} = q_{\text{glycerald}}$$

q_{gly} = specific rate of glycerol used in mmol.g⁻¹ dry weight cells.h⁻¹

q_{PD} = specific rate of 1,3-PD formation in mmol.g⁻¹ dry weight cells.h⁻¹

q_{pyr} = specific rate of pyruvate formation in mmol.g⁻¹ dry weight cells.h⁻¹

$q_{\text{glycerald}}$ = specific rate of glyceraldehyde formation in mmol.g⁻¹ dry weight cells.h⁻¹

$$q_{\text{fd-NAD}^+} = q_{\text{NADH cons}} - q_{\text{NADH product}}$$

The specific rate of NADH production by the fd-NAD⁺ reductase activity ($q_{\text{fd-NAD}^+}$) is the difference between the specific rate of NADH consumption ($q_{\text{NADH cons}}$) to form end-products and the specific rate of NADH production ($q_{\text{NADH product}}$) during substrate conversion to pyruvate.

$$Q \text{ NADH cons} = Q_{\text{PD}} + 2 Q_{\text{butyrate}}$$

$$Q \text{ NADH product} = 2 Q_{\text{pyruvate}}$$

Specific rate calculations with glucose as substrate:

$$q_{\text{glucose}} = \text{specific rate of glucose used in } \text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry weight cells} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$Q_{\text{NADH-fd}} = Q_{\text{pyruvate}} - Q_{\text{butyrate}} = Q_{\text{excess NADH}}$$

Where q_{glucose} is the specific rate of glucose used in units of $[\text{mmol} (\text{g dry wt cells})^{-1} \text{ h}^{-1}]$.

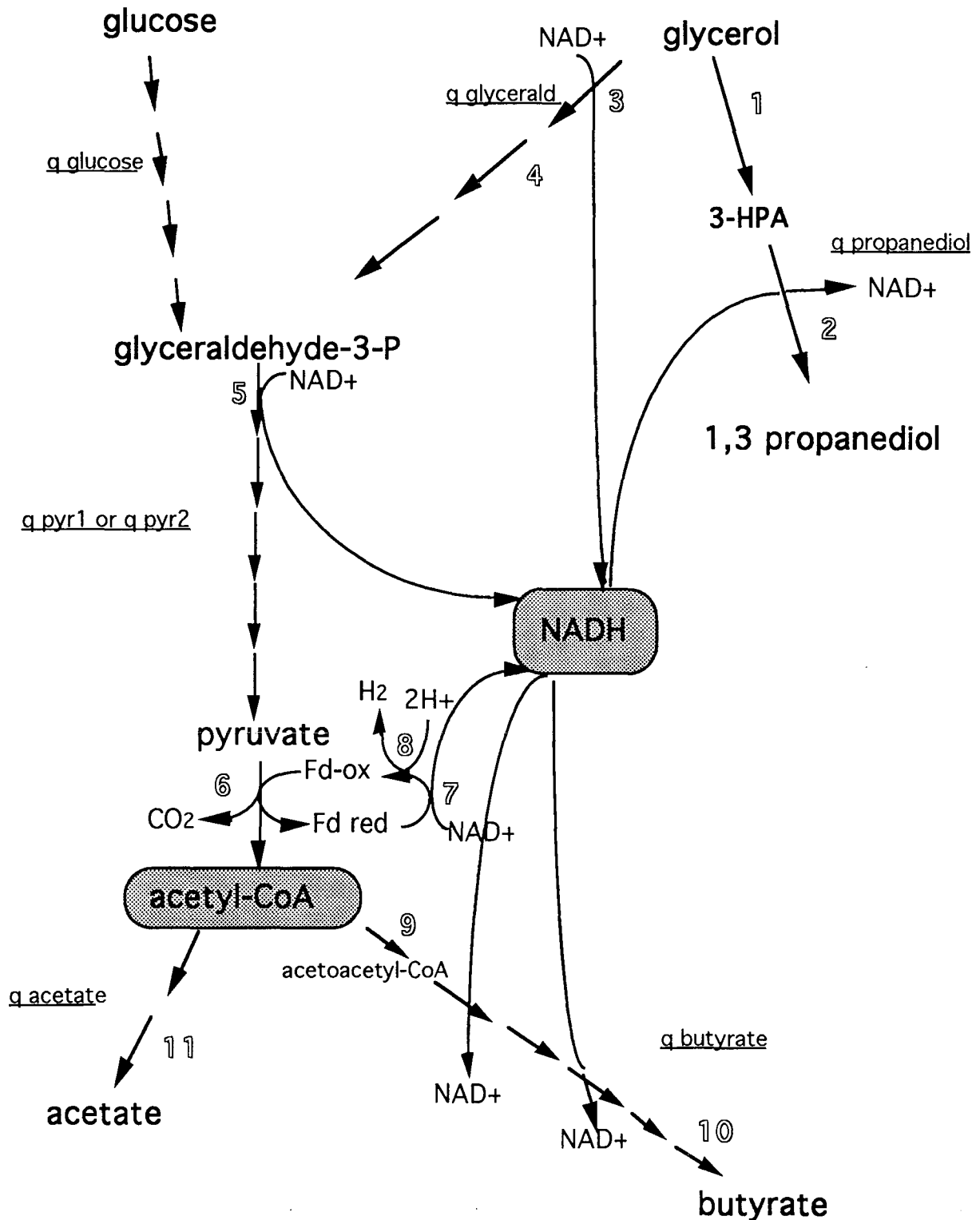


Fig.1. Schematic diagram depicting the catabolism of glucose and glycerol by *C. butyricum*.
 1, Diol dehydratase; 2, 1,3 PD dehydrogenase; 3, glycerol dehydrogenase; 4, dihydroxyacetone kinase; 5, glyceraldehyde-3-P dehydrogenase; 6, phosphoroclastic reaction; 7, NADH-ferredoxin oxidoreductase; 8, hydrogenase; 9, thiolase; 10, butyrate kinase; 11, acetate kinase.
 $q_{\text{glycerol}} = q_{\text{PD}} + q_{\text{pyr}}$; $q_{\text{pyr1}} = 2q_{\text{glucose}}$; $q_{\text{pyr2}} = q_{\text{glycerol}} - q_{\text{PD}}$

Results:

Carbon flow in *C. butyricum* grown in continuous culture under glycerol limitation: Data on the effect of D on growth and product formation with *C. butyricum* are compiled in Table 1. No significant concentration of residual glycerol was observed at D values of up to 0.26 h⁻¹. The dry weight was almost constant between 0.04 h⁻¹ and 0.26 h⁻¹ and decreased markedly at 0.30 h⁻¹ corresponding to glycerol accumulation.

Whatever the D value, conversion of glycerol into 1,3-PD was between 0.57 and 0.60 [mol PD (mol glycerol)⁻¹] showing that the carbon flux distribution through diol dehydratase and 1,3-PD dehydrogenase was balanced by the flux through glycerol dehydrogenase and dihydroxyacetone kinase. These facts were confirmed by study of the specific rates of glycerol utilization and product formation. Figure 2 shows the linearity of the specific rates of glycerol utilization and 1,3-PD and pyruvate formation as a function of D. Whereas at low D values, the cells produced more butyrate than acetate, at high D values, i.e. high carbon flux, a switch was observed and the cells produced more acetate than butyrate (Fig. 3).

Below a D of 0.15 h⁻¹, i.e. $q_{\text{pyr}} = 11.9 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, the specific rate of butyrate formation increased more rapidly than the specific rate of acetate formation (Fig. 3). Between 0.15 and 0.26 h⁻¹ there is an increase of the specific rate of acetate formation concomitant with a decrease of the specific rate of butyrate formation. The fact that the quantities of 1,3-PD formed were greater than the quantities of NADH generated (between 0.04 h⁻¹ and 0.26 h⁻¹, Table 1) in the catabolic reactions from glycerol to pyruvate suggested the existence of another source of NADH. Part of the reduced fd was reoxidized by the fd-NAD⁺ reductase; the specific rate of NADH generation by this activity increased from 0.8 to 4.5 mmol.h⁻¹.g⁻¹ in parallel with an increase in growth rate from 0.04 to 0.26 h⁻¹. At a D of 0.30 h⁻¹, due to the limitation of the butyrate pathway, the NADH produced by glycerol dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was sufficient for the formation of 1,3-PD.

Carbon flow in *C. butyricum* grown in continuous culture with glucose.

Cultures were grown in a chemostat at glucose concentrations of 5.55 mM, 16.6 mM and 55.5 mM (Table 2). Whereas with a glycerol-limited medium a rate of glycerol consumption of 46.5 mmole.h⁻¹.g⁻¹ was obtained without residual glycerol (Table 1, D = 0.26 h⁻¹), a specific rate as

Table 1. Effect of dilution rate on growth and product formation by *C. butyricum* DSM 5431 grown under glycerol or glucose limited chemostat cultures.

glycerol glucose input	Rate dilution h ⁻¹	Biomass g l ⁻¹	substrate used mmol l ⁻¹	Products (mmol liter ⁻¹)			Ac/But	conversion mol.mol ⁻¹	carbon recovery %	NADH(mmol)		NADH recovery %
				Acetate	Butyrate	1,3 PD				min	max	
glycerol (108.5 mM)	0.04	0.64 (0.07)	108 (13.1)	5.3 (0.6)	21.1 (1.2)	62 (3.0)	0.25	0.57	101	52.8	100.3	61
	0.08	0.64 (0.08)	108 (12.3)	5.1 (0.5)	20.4 (2.1)	64.6 (3.5)	0.25	0.60	102	51	96.9	66.6
	0.15	0.57 (0.06)	108 (12.2)	5.4 (0.5)	19.2 (0.9)	62.8 (2.9)	0.28	0.58	98.7	49.2	93	67.5
	0.26	0.60 (0.07)	107.4 (10.6)	7.9 (0.9)	15.4 (1.4)	64.8 (3.5)	0.51	0.60	96.4	46.6	85.3	75.9
	0.30	0.33 (0.02)	63.1 (5.2)	13.8 (1.2)	3.7 (0.8)	36.6 (1.5)	3.73	0.58	91.6	35	56.2	65.1
glucose (5.55 mM)	0.08	0.18 (0.11)	5.4 (0.6)	4.8 (1.3)	2.7 (1.8)	NA	1.8	NA	91	9.6	24.6	22
	0.30	0.19 (0.02)	5.2 (0.4)	5.9 (0.9)	3.6 (0.7)	NA	1.6	NA	94.6	11.8	19	30.5

() : standard deviation of four determinations.

NA : not applicable.

conversion : mole of propanediol per mole of glycerol.

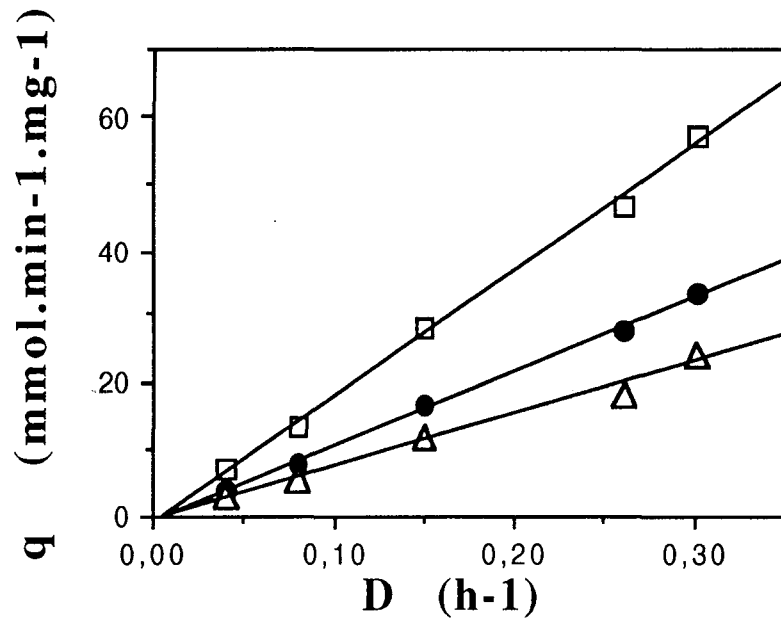


Fig.2. Influence of dilution rate on specific rate of glycerol utilization and propanediol production in a continuous culture of *C. butyricum*. The glycerol input concentration was 108 mM. \square : q_{glycerol} , \bullet : $q_{1,3\text{-PD}}$, Δ : $q_{\text{glyceraldehyde}} = q_{\text{pyruvate}}$

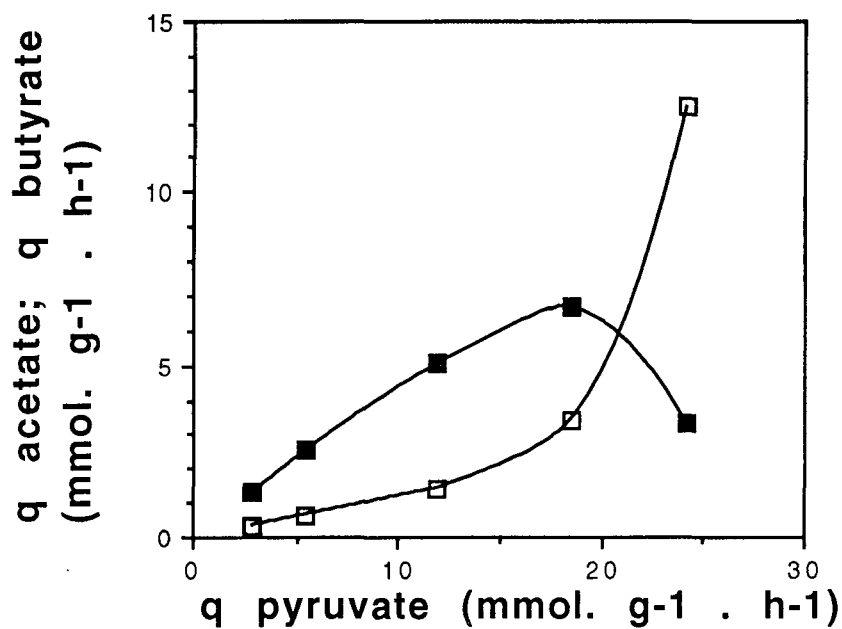


Fig.3. Influence of the specific rates of pyruvate production in a continuous culture of *C. butyricum*. on specific rates of acetate and butyrate production. The glycerol input concentration was 108 mM. \square : q_{acetate} , \blacksquare : q_{butyrate} ,

low as 2.1 mmol of glucose. $\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ led to residual glucose (Table 2). With a glucose input of 55.5 mM only 55 and 26 % were used at $D = 0.08 \text{ h}^{-1}$ and $D = 0.30 \text{ h}^{-1}$, respectively.

Fig. 1 compares glycerol and glucose as carbon sources for growth. They show a number of differences in catabolism but have in common the pathway from glyceraldehyde-3-P to pyruvate. The lower rate of glucose catabolism ($q_{\text{glu}} = 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, Table 2) compared to that of glycerol catabolism ($q_{\text{gly}} = 57.4 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, Fig.2) cannot be explained by a change in the activity of this pathway which remained almost the same for culture on glycerol ($q_{\text{pyr}} = 24.2 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, Fig.2) or on glucose ($q_{\text{pyr}} = 22.2 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, Table 2).

Glucose grown cultures produced butyrate and acetate. The difference between the specific production rate of NADH and the specific consumption rate indicates an excess of NADH which was reoxidized by the NADH-fd reductase and the reduced fd reoxidized by hydrogenase. The specific rate of NADH oxidation by the NADH-fd reductase increases in parallel with the specific rates of substrate consumption.

Levels of key metabolic enzyme activities from cell extracts of continuous glycerol limited steady state cultures of *C. butyricum*. As seen in Table 3, in the steady state cultures, *in vitro* glycerol dehydrogenase, 1,3-PD dehydrogenase and diol dehydratase were higher under conditions giving higher *in vivo* specific consumption or production rates. This correlation between *in vitro* activities and *in vivo* consumption and formation rates can also be observed in Fig. 4 where these parameters have been plotted against each other for a number of different steady state conditions. In contrast, whatever the value of D , the specific activities of thiolase were relatively constant. Concomitant with the increase in D , there was an increase of acetate kinase activity which was significantly higher at 0.30 h^{-1} , corresponding to the switch in acetate and butyrate formation (Fig.3). From the lowest ($D = 0.04 \text{ h}^{-1}$) to the highest ($D = 0.30 \text{ h}^{-1}$) D s values, acetate kinase increased 15.7 fold and butyrate kinase 2.2 fold. All the oxidoreductases exhibited maximum activity with NAD^+ : fd- NAD^+ reductase, NADH-fd reductase, glycerol- NAD^+ oxidoreductase and 1,3-PD- NAD^+ oxidoreductase activities were 6.1, 8.8, 7.6 and 6.2 fold higher, respectively, than with NADP^+ . The values of the phosphoroclastic reaction were fairly constant whereas hydrogenase activity was significantly higher at the low D of 0.04 h^{-1} , and decreased about 3.5 fold,

Table 2. Effect of dilution rate on growth and product formation by *C. butyricum* DSM 5431 grown under glucose chemostat cultures.

glucose input	Rate dilution (h ⁻¹)	Biomass (g l ⁻¹)	substrate used (mmol l ⁻¹)	Products (mmol liter ⁻¹)		Acetate/ Butyrate ratio	carbon recovery (%)
				Acetate	Butyrate		
glucose (16.6 mM)	0.08	0.55	14.4 (1.1)	7.5 (0.6)	10.3 (0.8)	0.73	97.6
	0.30	0.50	13.7 (1.3)	13.3 (1.2)	6.7 (0.5)	1.98	97.4
glucose (55.5 mM)	0.08	0.96	30.5 (1.9)	13.2 (1.3)	21.6 (1.8)	0.61	92.4
	0.30	0.39	14.4 (0.7)	12.7 (0.6)	6.8 (0.4)	1.29	91.3

() : standard deviation of four determinations.

Table 3. Effect of dilution rate on enzymatic activities from cell-free extracts of glycerol limited steady-state cultures of *C. butyricum* DSM 5431.

Enzyme / D (h ⁻¹)	Sp act (μmol. min ⁻¹ . mg ⁻¹)						
	glycerol (108.5 mM)					glucose (5.55 mM)	
	0.04	0.08	0.15	0.26	0.30	0.08	0.30
glycerol dehydrogenase	1.43 (0.32)	1.61 (0.35)	1.72 (0.34)	1.75 (0.40)	2.41 (0.43)	np	np
1,3 PD dehydrogenase	0.58 (0.11)	0.74 (0.18)	0.87 (0.26)	1.07 (0.32)	1.22 (0.19)	np	np
Diol dehydratase	0.24 (0.06)	0.27 (0.07)	0.32 (0.08)	0.35 (0.08)	0.39 (0.09)	np	np
Thiolase	0.185 (0.027)	0.178 (0.025)	0.177 (0.026)	0.181 (0.032)	0.153 (0.022)	0.169 (0.025)	0.160 (0.022)
Acetate kinase	0.57 (0.17)	0.89 (0.21)	0.72 (0.22)	1.01 (0.17)	9.04 (0.85)	4.78 (0.76)	5.92 (0.83)
Butyrate kinase	0.54 (0.11)	0.79 (0.17)	0.89 (0.21)	1.23 (0.23)	1.20 (0.31)	2.71 (0.41)	3.57 (0.46)
Hydrogenase	0.11 (0.03)	0.03 (0.01)	0.025 (0.012)	0.027 (0.014)	0.037 (0.014)	0.080 (0.023)	0.164 (0.04)
Phosphoroclastic	0.028 (0.011)	0.036 (0.013)	0.04 (0.018)	0.033 (0.011)	0.048 (0.021)	0.091 (0.027)	0.107 (0.034)
Ferredoxin-NAD reductase	0.0091	0.011	0.0095	0.0128	0.009	0.007	0.007
NADH-ferredoxin reductase	0.011	0.0096	0.0083	0.0093	0.008	0.009	0.013

() : standard deviation of four determinations.

np : not possible

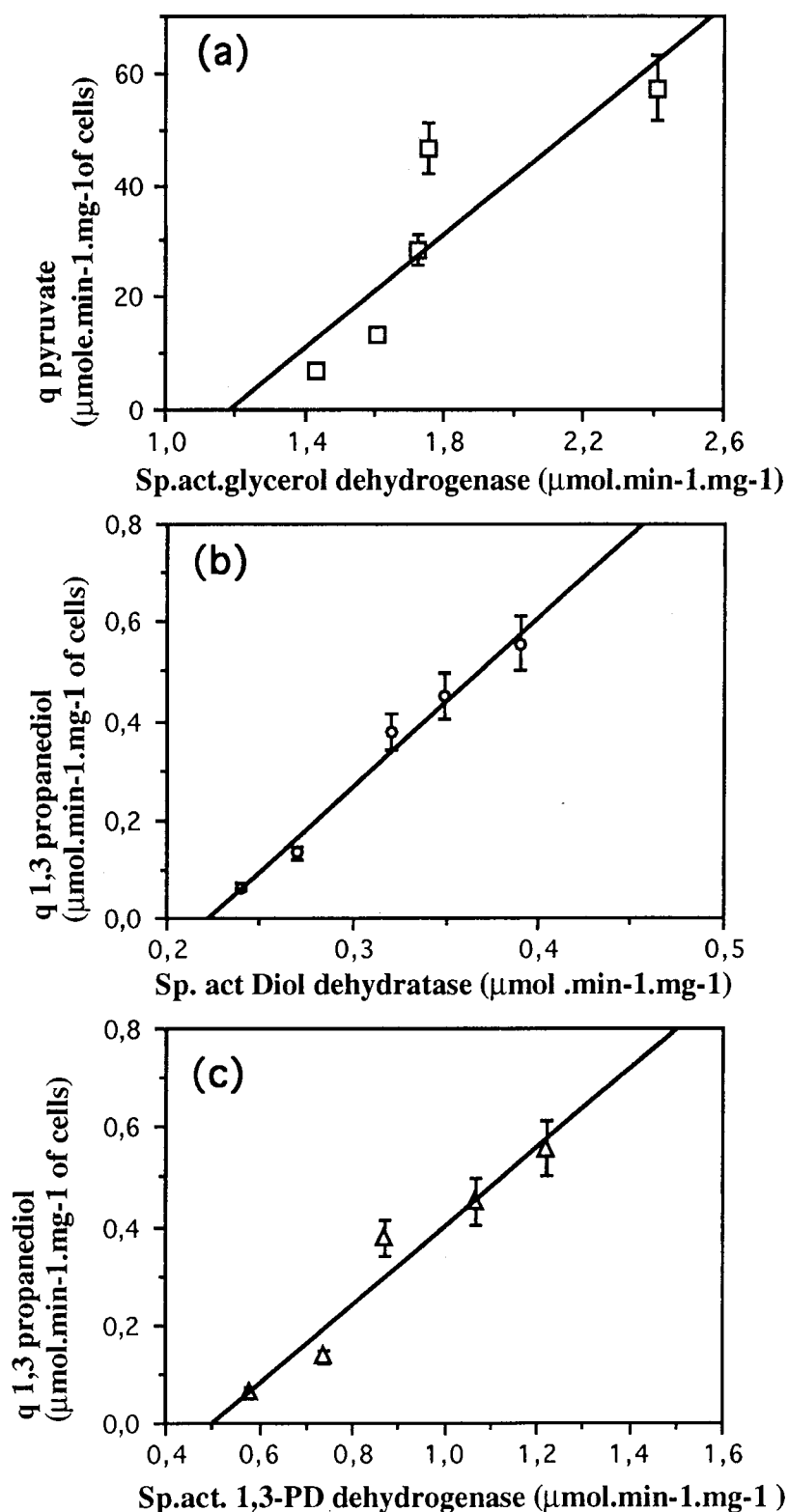


Fig.4. *In vivo* specific carbon fluxes as a function of *in vitro* specific enzyme activities in a continuous culture of *C. butyricum*. The glycerol input concentration was 108 mM. (a) *in vivo* specific carbon fluxes through the glyceraldehyde-3-P path versus specific glycerol dehydrogenase activities. (b,c) *in vivo* specific carbon fluxes through the 1,3-PD pathway versus specific diol dehydratase activities (b) and versus 1,3-PD dehydrogenase activities (c).

at 0.30 h^{-1} . The electrons which are ultimately transferred to NAD^+ by the fd- NAD^+ reductase are obtained from the oxidation of pyruvate via the endogenous pyruvate dehydrogenase, hence the fd- NAD^+ reductase activity was dependent on the phosphoroclastic reaction and is in the same range of activity, i.e. in the range of nmol. Fd- NAD^+ and NADH-fd reductase activities were detected with almost the same ratio at all D values.

Levels of key metabolic enzyme activities from cell extracts of continuous glucose limited steady state cultures of *C. butyricum*. No activity of glycerol dehydrogenase, 1,3-PD dehydrogenase and diol dehydratase was detected in cell-free extracts of glucose grown cells. Thiolase activity was similar to that found in extracts of cells grown on glycerol. The level of this enzyme is low; for comparison, in *C. pasteurianum* ATCC 6013 thiolase activity determined in the same physiological direction was around $1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, i.e. sixfold higher. High levels of acetate kinase were found in cell-free extracts of glucose-grown cells. Butyrate kinase, hydrogenase and phosphoroclastic activities were increased in glucose-grown cells compared to glycerol-grown cells. Nevertheless, the hydrogenase activity of *C. butyricum* DSM 5431 is weak, for example we found in cell-free extracts of *C. pasteurianum* ATCC 6013 a specific activity around $7.4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, i.e. 11.5-fold higher, in cell-free extracts of *C. pasteurianum* ATCC 6013. The specific activities of fd- NAD^+ reductase and NADH-fd reductase were in the same range for cells grown either on glucose or on glycerol.

Intracellular acetyl-CoA, NAD^+ and NADH pools of continuous steady state cultures of *C. butyricum*. The levels of NAD^+ , NADH and acetyl-CoA for the steady states on glycerol and on glucose are shown in Table 4. In glycerol-grown cells the concentrations of acetyl-CoA, of NADH and of the total $\text{NAD}^+ + \text{NADH}$ increased sharply with the increase in D and a switch in the NAD^+/NADH ratios was observed above a D of 0.15 h^{-1} . In glucose-grown cells, the levels of NADH were always higher than the NAD^+ levels and the concentrations of the three compounds were at or well above the levels of glycerol-grown cultures. Fluorometric and colourimetric methods for NAD^+ and NADH assay gave similar results.

Table 4. Nucleotide levels of continuous steady-state of *C. butyricum* DSM 5431 with glucose or glycerol as substrate.

substrate	D (h ⁻¹)	Nucleotide concn. (μmol . g ⁻¹ [dry cell mass] [SD] , n = 6)				
		NAD ⁺	NADH	NAD ⁺ +NADH	NADH/NAD ⁺	Acetyl-CoA
glycerol (108.5 mM)	0.04	7.5 (0.3)	3.90 (0.2)	11.4	0.52	12.1 (0.8)
	0.08	12.1 (0.7)	7.5 (0.5)	19.6	0.62	11.0 (0.7)
	0.15	14.5 (1.0)	8.2 (0.6)	22.7	0.56	15.3 (0.9)
	0.26	8.6 (0.6)	15.9 (0.9)	24.5	1.84	17.2 (1.2)
	0.30	15.3 (0.9)	24.5 (2.2)	39.8	1.60	24.1 (1.9)
glucose (5.55 mM)	0.08	12.2 (0.8)	20.8 (1.2)	33.0	1.70	24.1 (1.2)
	0.30	12.2 (0.7)	25.3 (1.3)	37.5	2.06	38.8 (2.3)
glucose (16.5 mM)	0.08	12.4 (0.8)	25.2 (1.2)	37.6	2.00	15.2 (0.9)
	0.30	12.8 (0.7)	28.4 (1.4)	41.2	2.20	33.4 (2.0)
glucose (55.5 mM)	0.08	17.1 (1.0)	20.3 (1.2)	37.4	1.18	23.1 (1.1)
	0.30	11.1 (0.6)	27.4 (1.6)	38.5	2.45	32.3 (1.9)

Each percentage is the mean ± SD of six determinations from three separated cultures measured either by colorimetric or fluorimetric methods.

Discussion

Our results show clearly that growing *C. butyricum* in continuous culture at different growth rates and under glycerol limitation did not affect the glycerol conversion into 1,3-PD. This differs dramatically from *C. acetobutylicum*, another producer of reduced compounds, where low D values were associated with a rise in solvent formation and high D values with the accumulation of acetic and butyric acids (Bahl & Gottschalk, 1985; Fick *et al.*, 1985). The relative constancy of the $q_{PD}/q_{\text{glyceraldehyde}}$ ratio in the fermentation of glycerol suggests the presence of regulatory mechanisms that precisely partition the flow between the competing pathways. The enzymes glycerol dehydrogenase, diol dehydratase and 1,3-PD dehydrogenase constitute a branch point and we found increasing levels of these enzyme activities with the increasing D, thus contributing to a constant ratio of carbon flux through that branch point (Fig. 2). This allows us to explain the minor changes found for glycerol conversion into 1,3-PD, whatever the value of the D. The main observation for high D was the decrease in butyrate production and a concomitant increase in acetate formed (Table 1). These changes in the acetate/butyrate ratio were also observed in *C. butyricum* growing on glycerol (Günzel, 1991) and in *C. tyrobutyricum* (Michel-Savin *et al.*, 1990) and *C. butyricum* growing on glucose (Crabbendam *et al.*, 1985). The production of acetate or butyrate constitutes another important branch point and when the carbon flux switches from butyric acid to acetic acid formation we observed a corresponding shift in the relative activities of acetate and butyrate kinase, whereas the specific activities of thiolase were not affected by changes in D. Glucose or glycerol-grown cells have in common the pathway from glyceraldehyde-3-P to pyruvate and whatever the carbon source the flux q_{pyruvate} increased as D increased producing large amounts of acetyl-CoA. The intracellular concentration of acetyl-CoA increased from 12.1 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ at $D = 0.04 \text{ h}^{-1}$ to 24.1 at $D = 0.30 \text{ h}^{-1}$ when glycerol was the carbon source. The shift in carbon flux took place at a D of roughly 0.26 h^{-1} , when 17.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ of acetyl-CoA were produced.

The thiolase that converts acetyl-CoA to acetoacetyl-CoA may be the bottleneck for carbon flux to butyrate biosynthesis since our results show that its level did not change significantly with D. This suggests that the acetate pathway is an important pathway of overflow metabolism when the specific rate of acetyl-CoA formation increases above a critical threshold. For a q_{pyruvate}

which increased 6.6-fold from $D = 0.04 \text{ h}^{-1}$ to $D = 0.26 \text{ h}^{-1}$, the intracellular NADH increased fourfold, whereas between $D = 0.26 \text{ h}^{-1}$ and $D = 0.30 \text{ h}^{-1}$ the intracellular concentration increased less than twofold. This can be explained by the fact that between $D = 0.04$ and 0.26 h^{-1} , the formation both of PD and butyrate regenerates NAD^+ , whereas above $D = 0.26 \text{ h}^{-1}$, NADH was used principally (high level of intracellular NADH) for PD formation. Considering that oxidation of NADH by 1,3-PD dehydrogenase was linked to the production of 3-HPA by diol dehydratase, the fact that the intracellular concentrations of NADH were extremely high demonstrates that diol dehydratase activity was the rate-limiting step in 1,3-PD formation; in that way 3-HPA does not accumulate. This limitation was maintained whatever the value of the carbon flux since the activity of the all three enzymes: glycerol dehydrogenase, 1,3-PD dehydrogenase and glycerol dehydratase were regulated in similar ways (Fig. 4). We suggest that the high concentration of NADH in the cell prevents the accumulation of 3-HPA which is a very reactive and toxic compound which has been shown to be excreted by *Lactobacillus reuteri* and termed reuterin (Axelsson *et al.*, 1989; Chung *et al.*, 1989). It is a bioactive substance which at low concentrations inhibits the growth of Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and lower eucaryotic organisms .

A number of investigators have noted the more reduced state of the glycerol in comparison with glucose and suggested that glycerol could stimulate hydrogen production (Heyndrickx *et al.*, 1991a, Dabrock *et al.*, 1992). In fact, growth of *C. butyricum* on glycerol induced the four enzymes of the *dha* regulon (Heyndrickx *et al.*, 1991b, Tong *et al.*, 1991) and regenerated the excess reducing equivalents via the butyrate pathway and principally via the highly active 1,3-PD dehydrogenase. In glycerol catabolism, our data indicate that the NADH produced by glycerol dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is not sufficient for 1,3-PD formation and that part of the reduced fd produced by the pyruvate fd oxidoreductase is reoxidized by the fd- NAD^+ reductase activity to produce NADH.

The reduction of NAD^+ by reduced fd and the reductase occurred via the endogenous pyruvate dehydrogenase and hence the fd- NAD^+ reductase activities were dependent on the phosphoroclastic reaction. In cell-free extracts of glycerol-limited cultures, these two reactions showed similar specific activities; between 0.04 and 0.26 h^{-1} the phosphoroclastic activity was

2.6 to 4.2-fold higher than the fd-NAD⁺ reductase activity. When cells were grown on glycerol, a 80 % decrease of the hydrogenase activity was noted compared to growth on glucose at all D values. The low level of hydrogenase associated with the fd-NAD⁺ reductase activity contributed to production of NADH. This kind of regulation, a high level of intracellular NADH and a decrease of the hydrogenase activity, has been reported elsewhere (Girbal *et al.*, 1995).

In contrast, growth on glucose generates reducing equivalents which are released in excess in the glycolytic pathway and are reoxidized by NADH-fd reductase and higher levels of hydrogenase (Table 3). In glucose-grown cells, the low level of thiolase (Table 3) and the high intracellular concentration of acetyl-CoA and of NADH (Table 4) suggest that the butyric pathway was a bottleneck for the carbon flux and hence insufficient to regenerate the NADH produced by glycolysis or the acetyl-CoA produced by the phosphoroclastic reaction, and in turn a high level of NADH and acetyl-CoA explain the low amount of glucose used. On the basis of the results presented it is apparent that *C. butyricum* DSM 5431 is not adapted to grow at high glucose concentration since the low specific formation rate of butyric acid leads to increased levels of acetyl-CoA and NADH. This high level of NADH was reported to inhibit glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *C. acetobutylicum* (Girbal & Soucaille, 1994) but surprisingly, the specific rates of pyruvate formation were almost the same either on glucose or glycerol whatever the NADH/NAD⁺ ratio. We can explain a higher carbon flow on glycerol by the fact that NADH is reoxidized by both butyric and PD pathways. Nevertheless, a high flux of glycerol led also to a high level of NADH due to the limited production of 3-HPA by diol dehydratase. The variation of NAD⁺ and NADH content with D values has already been reported in a *Pseudomonas sp.* (Matin & Gottschall, 1976). The reoxidation of NADH by 1,3-PD and butyrate biosynthesis being limiting steps, catabolism of the carbon substrate may be facilitated by a concomitant increase in NAD⁺ biosynthesis which would tend to maintain the NADH/NAD⁺ ratios. Usually intracellular NAD⁺ plus NADH concentrations in clostridia are around 7-14 $\mu\text{moles.g}^{-1}$ dry cell mass (Meyer & Papoutsakis, 1989 ; Girbal & Soucaille, 1994); nevertheless values as high as 39.8 $\mu\text{moles.g}^{-1}$ dry cell mass were reported in *Clostridium kluyveri* (Decker & Pfister, 1972). Glycerol dehydratase is rather difficult to

measure and no detailed investigations of this enzyme have been reported in clostridia. From our results it is apparent that the glycerol dehydratase plays a key function in glycerol catabolism and remains to be more fully studied.

Acknowledgements. The authors wish to thank Dr. H. BIEBL and Ms A. REIMANN for helpful discussions and are grateful to E. Guedon and E. Spiesser for skilful co-operation in part of the experiments.

This work was supported by the commission of the European communities AAIR programme : Contrat N° AIR 2-CT93-0825 (DG 12 SSMA).

References.

- Axelsson, L., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. & Lindgren, S.E. (1989).** Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb Ecol Health Dis* **2**, 131-136.
- Bahl, H. & Gottschalk, G. (1985).** Parameters affecting solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Biotechnol Bioeng* **514**, 217-223.
- Berndt, H. & Schlegel, H.G. (1975).** Kinetics and properties of β -ketothiolase from *Clostridium pasteurianum*. *Arch Microbiol* **103**, 21-30.
- Biebl, H. (1991).** Glycerol fermentation of 1,3-PD by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Appl Microbiol Biotechnol* **35**, 701-705.
- Biebl, H. & Pfenning, 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.
- Biebl, H. , Marten, S., Hippe, H. & Deckwer, W.D. (1992).** Glycerol conversion to 1,3-PD by newly isolated clostridia. *Appl Microbiol Biotechnol* **36**, 592-597.
- Blusson, H., Petitdemange, H. & Gay, R. (1981).** A new, fast, and sensitive assay for NADH-fd oxidoreductase detection in clostridia. *Anal Biochem* **110**, 176-181.
- Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Chung, T.C., Axelsson, L., Lindgren, S.E. & Dobrogosz, W.J. (1989).** In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microb Ecol Health Dis* **2**, 137-144.
- Crabbendam, P.M., Neijssel, O.M. & Tempest, D.W. (1985).** Metabolic and energetic aspects of the growth of *Clostridium butyricum* on glucose in chemostat culture. *Arch Microbiol* **142**, 375-382.
- Dabrock, B., Bahl, H. & Gottschalk, G. (1992).** Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 1233-1239.
- Decker, K. (1965).** Acetyl-CoA. In *methods of enzymatic analysis*, pp. 419-424. Edited by H. U. Bergmeyer, 2nd edn. N. Y. and London: Verlag Chemie Academic press.

- Decker, K. & Pfitzer, S. (1972).** Determination of steady-state concentrations of adenine nucleotides in growing *Clostridium kluyveri* cells by biosynthetic labeling. *Anal Biochem* **50**, 529-539.
- Fick, M., Pierrot, P. & Engasser, J.M. (1985).** Optimal conditions for long-term stability of acetone-butanol production by continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol Lett* **7**, 503-508.
- Girbal, L. & Soucaille, P. (1994).** Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures: role of NADH/NAD ratio and ATP pool. *J Bacteriol* **176**, 6433-6438.
- Girbal, L., Vasconcelos, I., Saint-Amans, S. & Soucaille, P. (1995).** How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiol Rev* **16**, 151-162.
- Günzel, B. (1991).** Mikrobielle herstellung von 1,3-PD durch *Clostridium butyricum* und adsorptive aufarbeitung von diolen. PhD thesis, University of Braunschweig.
- Günzel, B., Yonsel, S. & Deckwer, W.D. (1991).** Fermentative production of 1,3-PD from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m³. *Appl Microbiol Biotechnol* **36**, 289-294.
- Heyndrickx, M., De Vos, P. & Deley, J. (1991a).** Fermentation characteristics of *Clostridium pasteurianum* LMG 3285 grown on glucose and mannitol. *J Appl Bacteriol* **70**, 52-58.
- Heyndrickx, M., De Vos, P., Vancanneyt, M. & Deley, J. (1991b).** The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212 t2 and 1213 t1 and *Clostridium pasteurianum* LMG 3285. *Appl Microbiol Biotechnol* **34**, 637-642.
- Junelles, A.M., Janati-Idrissi, R., Petitdemange, H. & Gay, R. (1988).** Iron effect on acetone-butanol fermentation. *Curr Microbiol* **17**, 299-303.
- Jungermann, K., Thauer, R. K., Leimenstoll, G. & Decker, K. (1973).** Function of reduced pyridine nucleotide-fd 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 *Methods of enzymatic analysis*, pp. 2045-2059. Edited by Bergmeyer, H. U. 2nd ed., vol. 4. New York : Academic press.

- Lipmann, F. & Tuttle, L.C. (1945).** A specific micromethod for determination of acyl-phosphates. *J Biol Chem* **159**, 21-28.
- Lynen, F., Wesseley, L., Wieland, O. & Rueff, L. (1952).** Zur β -oxidation von Fettsäuren *Angew Chem* **64**, 687.
- Matin, A & Gottschall, J.C. (1976).** Influence of dilution rate on NAD(P) and NAD(P)H concentrations and ratios in a *Pseudomonas* sp. grown in continuous culture. *J Gen Microbiol* **94**, 333.
- Meyer, C.L. & Papoutsakis, E.T. (1989).** Increased levels of ATP and NADH are associated with increased solvent production in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **30**, 450-459.
- Michel-Savin, D., Marchal, R. & Vandecasteele, J.P. (1990).** Butyrate production in continuous culture of *Clostridium tyrobutyricum*: effect of end-product inhibition. *Appl Microbiol Biotechnol* **33**, 127-131.
- Mortenson, L.E., Valentine, R.C. & Carnahan J.E. (1963).** Fd in the phosphoroclastic reaction of pyruvic acid and its relation to nitrogen fixation in *Clostridium pasteurianum*. *J Biol Chem* **238**, 794-800.
- Petitdemange, H., Cherrier, C., Raval, G. & Gay R. (1976).** Regulation of the NADH-fd oxidoreductases in clostridia of butyric group. *Biochim Biophys Acta* **421**, 334-347.
- Ruch, F.E., Lengeler, J. & Lin, E.C. (1974).** Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **119**, 50-56.
- Tubbs, P.K. & Garland, P.B. (1969).** Assays of coenzyme A and some Acyl derivatives. In *methods in enzymology*, vol. XIII, pp. 535-551. Edited by Lowenstein J.M. New York and London: Academic press.
- Tong, I.T., Liao, H.H. & Cameron, D.C. (1991).** 1,3-propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae dha* regulon. *Appl Environ Microbiol* **57**, 3541-3546.
- Toraya, T., Ushio, K., Fukui, S. & Hogenkamp, H.P.C. (1977).** Studies on the mechanism of the adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction by the 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, J.W.T. & 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, D.R. (1993). *The clostridia and biotechnology*. Edited by D.R. Woods, Stoneham, MA : Butterworth-Heinemann.

II.3. Conclusion.

La voie métabolique de fermentation du glycérol chez *C. butyricum* possède 2 branchements :

- Le premier permet la production du glycéraldéhyde-3-phosphate et du 1,3-propanediol.
- Le second permet la production de l'acide acétique et de l'acide butyrique.

Nos résultats montrent clairement que la croissance de *C. butyricum*, en culture continue, à différents taux de dilution n'affecte pas le taux de conversion du glycérol en 1,3-propanediol. La comparaison des flux carbonés de production du 1,3-propanediol et de production des acides montre que ces deux voies évoluent parallèlement quel que soit le taux de dilution étudié. L'augmentation du flux carboné est accompagnée par une évolution du rapport acétate / butyrate jusqu'au moment où l'on observe une inversion de ce dernier qui d'une valeur inférieure à 1 devient supérieur à 1. Cette augmentation est corrélée avec la multiplication de l'activité spécifique de l'acétate kinase par un facteur 9 et de la stabilité de l'activité spécifique de la butyrate kinase. Ce changement est observé au moment où l'accumulation intracellulaire de l'acétyl-CoA devient importante ce qui pourrait s'expliquer par le fait que l'activité de la thiolase ne permet plus la condensation de 2 molécules d'acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA. Cette diminution de la production du butyrate ne permet plus l'utilisation des deux molécules de NADH ce qui entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de NADH car la voie majeure de régénération du NAD⁺ qui est alors la voie de production du 1,3-propanediol ne permet plus l'oxydation de l'excès des éléments réducteurs produits. L'oxydation du NADH par la 1,3-PD déshydrogénase 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-propanediol par *C. butyricum*, ce qui permet à cette bactérie d'éviter l'accumulation du 3-HPA, produit très toxique.

Nos résultats démontrent aussi que *C. butyricum* ne peut pas utiliser de grandes concentrations de glucose puisque la NADH-ferrédoxine réductase et l'hydrogénase ainsi que la voie de production du butyrate sont insuffisantes pour régénérer les éléments réduits produits par la glycolyse.

Partie 3. Isolement des mutants de *C. butyricum*.

III. RECHERCHE DES MUTANTS DE *C. BUTYRICUM* RÉSISTANTS À DE FORTES CONCENTRATIONS DE 1,3-PROPANEDIOL ET DE GLYCÉROL.

III.1. Introduction.

Les chercheurs qui travaillaient sur la fermentation du glycérol par les Clostridia étaient d'accord sur le fait que des mutants qui ne produiraient pas de butyrate et ne dégageraient pas d'hydrogène moléculaire auraient un rendement de production en 1,3-propanediol (1,3-PD) amélioré. En effet ces produits utilisent des éléments réducteurs qui pourraient être utilisés dans la production du 1,3-PD. Théoriquement, un mutant qui ne produirait ni hydrogène, ni butyrate présenterait un rendement théorique de conversion du glycérol en 1,3-PD de 0,72 contre 0,61-0,65 pour les souches actuelles.

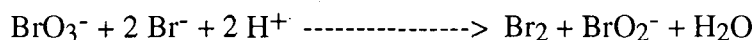
Toutes les productions biologiques sont également limitées par l'effet inhibiteur du substrat et des métabolites. La recherche de mutants de résistances aux substrats et aux produits de fermentation est également intéressante pour améliorer les performances de ces productions grâce à l'augmentation des concentrations des métabolites.

Dans un premier temps, afin d'améliorer la production du 1,3-propanediol, nous avons cherché à obtenir des mutants résistants à de fortes concentrations en 1,3-propanediol et en glycérol qui produisent moins d'acides et ne dégagent plus d'hydrogène moléculaire.

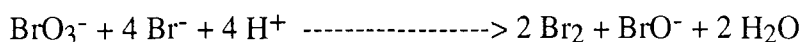
Pour cela, nous avons mutagénisé la population de *C. butyricum* DSM 5431 en phase exponentielle de croissance par le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NMNG) en milieu liquide et deux sélections successives ont été effectuées :

- exposition de la population de *C. butyricum* mutée à des concentrations élevées en 1,3-PD. Seuls les mutants résistants à de telles concentrations vont être sélectionnés.

- exposition de ces mutants résistants à des concentrations élevées en bromure-bromate ce qui permettrait de sélectionner des mutants altérés dans la production des acides et donc celle de l'hydrogène (les mutants qui produisent moins d'acides). En effet le principe de cette méthode est le suivant : les ions bromate et bromure réagissent entre eux en présence d'un excès de protons pour donner les éléments brome et bromite selon les réactions suivantes :



et le bromite produit réagit encore pour donner :



Le produit majeur obtenu est le brome. Donc la production d'acide lors de la fermentation des glucides par les bactéries en présence de bromure et de bromate permettrait la formation de brome qui est toxique pour ces bactéries ("proton suicide"). Cette méthode aurait plusieurs avantages :

- elle est appliquée directement dans le milieu de culture (ne nécessite pas de milieu défini)
- les mutants sont sélectionnés directement sur un milieu solide contenant un mélange composé de bromure-bromate-sucre.

la seule condition nécessaire pour l'utilisation de cette méthode est que la bactérie soit productrice d'acide.

Cette méthode a été utilisée par Winkelman et Clark (1984) pour isoler des mutants d'*Escherichia coli* qui ne produisent pas d'acide sur un milieu de culture contenant du glucose comme substrat. Cueto et Méndez (1990) ont réussi à isoler par la même méthode des mutants de *Clostridium acetobutylicum* qui produisent plus de solvants et moins d'acides que la souche sauvage.

III.2. Résultats.

Les résultats des expériences de recherche de mutants de *C. butyricum* résistants à de fortes concentrations en 1,3-propanediol et produisant moins d'hydrogène sont présentés dans l'article intitulé : **"Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids"**.

Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61 (12), 4413-4417

Isolation and Characterization of Mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 With Increased Resistance to 1,3-propanediol and Altered Production of Acids.

Running title: *Clostridium butyricum* mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered quantities of acids.

Abbad-Andaloussi S., Manginot-Dürr C., Amine J., Petitedemange E. and
Petitedemange* H.

Laboratoire de Chimie Biologique I,
Université HENRI POINCARÉ, Nancy I,
B. P. 239,
54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex
France

Tel. : 83-91-20-53

Fax. : 83-91-25-50

* Corresponding author

ABSTRACT.

Clostridium butyricum mutants were isolated from the parent strain DSM 5431 after mutagenesis with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and two selection procedures: osmotic pressure and the proton suicide method. Isolated mutants were more resistant to glycerol and to 1,3-propanediol (1,3-PD) than the wild-type, and they produced more biomass. In batch culture on 62 g of glycerol by liter, the wild-type produced more acetic acid than butyrate, with an acetate/butyrate ratio of 5.0, whereas the mutants produced almost the same quantities of both acids or more butyrate than acetate with acetate/butyrate ratios from 0.6 to 1.1. The total acid formation was higher in the wild-type strain. Results of analysis of key metabolic enzymatic activities were in accordance with the pattern of fermentation product formation: either the butyrate kinase activity increased or acetate kinase activity decreased in cell extracts of the mutants. A decreased level of the hydrogenase and NADH-ferredoxin activities concomitant with an increase in ferredoxin-NAD⁺ reductase activities support the conclusion that the maximum percentage of NADH available and used for the formation of 1,3-PD was higher for the mutants (97-100 %) than for the wild-type (70 %).

In fed-batch culture, at the end of the fermentation (72 hours for the wild-type strain and 80 to 85 h for the mutants), 44 % more glycerol were consumed and 50 % more 1,3-PD was produced by the mutants than by the wild-type strain.

INTRODUCTION.

Production of 1,3-propanediol (1,3-PD) by several groups of bacteria has been known for a long time (1, 11), but in recent years, new interest in this fermentation has developed (7, 14). Chemical production by fermentation usually results in a low concentration of product. In addition, substrate, product or both may inhibit product formation. Such is the case for *Clostridium butyricum*, for which growth is totally inhibited at concentrations of 788 mM 1,3-PD and 1,053 mM glycerol (5). In addition to 1,3-PD, acetic and butyric acids are produced and are highly toxic at a concentration as low as 70 mM (2).

Many bacteria have developed mechanisms that allow them to tolerate exposure to multiple stresses, such as starvation and various ranges of pH, osmotic pressure, temperature, and redox potential (19). By using these physical agents as the means of selection, it may be possible to obtain strains that are better able to withstand certain kinds of stresses. This could be achieved by using high levels of metabolic product, 1,3-PD, and pH as selective pressures. The purpose of this study was to isolate mutants that were more product and substrate tolerant than the organism from which they were derived.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals were reagent grade. Enzymes and coenzymes were obtained from Sigma Chimie, St Quentin Fallavier, France. All gases used were purchased from Air Liquide, Paris, France.

Organism and medium : *C. butyricum* DSM 5431 was used. The spores of the strain were stored at 4 °C in Reinforced Clostridial Medium (RCM; Oxoid Ltd., Basingstoke, England).

The preculture medium was made in wheaton serum vials containing the following components per liter of distilled water: glycerol, 20 g; K₂HPO₄, 1.0 g; KH₂PO₄, 0.5 g; (NH₄)₂SO₄, 2.0 g; MgSO₄ · 7 H₂O, 0.2 g; CaCl₂ · 2 H₂O, 15 mg; FeSO₄ · 7 H₂O, 5 mg; CaCO₃, 2.0 g; yeast extract, 1.0 g; trace element solution SL7 (3), 2 ml. The growth temperature was 32 °C. This medium, without CaCO₃ and with 62 g of glycerol per liter, was used as the culture medium. An exponential culture grown in the preculture medium was used as inoculum (10 %, [vol/vol]) in a fermentor (LSL-Biolafitte, St Germain en Laye, France) consisting of a 2-liter growth vessel with a 1-liter working volume. The culture was stirred at 100 rpm. The pH was maintained at 7.0 by the automatic addition of 2 M KOH.

For fed-batch cultures, the initial concentration of glycerol in the fermentor was 62 g/l. After about 16 h, the initial glycerol was consumed and additional glycerol was fed to the reactor in amounts of 20 g/l. This was done 5 times for the parent strain and 10 times for the mutants.

Analytical methods : Glycerol was determined enzymatically by glycerol kinase and L-lactate dehydrogenase enzymes using the test kit and instructions of Bœhringer, Mannheim, Germany. Concentrations of 1,3-propanediol, 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 by 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 analyzed with an Intersmat ICR IB Integrator.

The cell concentrations were estimated as cell dry weight using a predetermined correlation between A650 (UV160A double beam spectrophotometer, Shimatzu, Kyoto, Japon) and cell dry weight.

Mutagenesis and mutant selection : For mutagenesis, 10 ml of exponential-phase cells of *C. butyricum* DSM 5431 were treated in Hungate tubes with 0.1 ml of 1 % (wt/vol) N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) at 34 °C for 60 min. NTG is the mutagen most commonly used to obtain clostridial mutants (24), and under the conditions we used, about 1 of 100 cells survived. Following centrifugation and two washings with fresh sterile RCM, cell samples were inoculated into RCM medium supplemented with 108 mM glycerol (10 g/l). When cells were in the exponential growth phase, 526 mM of 1,3-PD were added for 24 h at 34 °C to select 1,3-PD-resistant mutants. Samples of this culture (0.1 ml) were plated on Brain Heart Infusion medium (DIFCO laboratories, Detroit, Mich.) containing agar (15 g/l), glucose (8 g/l), 175 mM NaBr, and 175 mM NaBrO₃; the pH was set to 6.0 with phosphoric acid; and anaerobic growth occurred in anaerobic jars (Oxoid) under an H₂-CO₂ atmosphere generated by gas-generating kits (GASPAK, BBL Microbiology system, Cockeysville, Md.). This method (27), called the proton suicide method, relies on the production of elemental bromine from a mixture of bromide and bromate under acidic conditions. The acid reacts with the sodium bromate and bromide salts and releases toxic bromine which is lethal for cells producing acid. Since more acids were produced with glucose-grown than with glycerol-grown cells, mutants were directly selected by plating onto bromate-bromide-glucose medium, and the survivors were expected to have mutations affecting acid synthesis.

Glycerol and 1,3-propanediol tolerance. Inhibition was studied by using test tubes containing 9 ml culture medium with different concentrations of glycerol or 1,3-PD. Cultures were sown with 1 ml of inoculum and incubated at 34 °C. The optical density at 650 nm was measured after 2, 4 and 6 h in each tube. the percent inhibition was determined from the following equation :

$$\frac{(OD_{c(t=6h)} - OD_{c(t=0)}) - (OD_{Ei(t=6h)} - OD_{Ei(t=0)})}{(OD_{c(t=6h)} - OD_{c(t=0)})} \times 100$$

Where c means control tube: ($OD_{c(t=6h)} - OD_{c(t=0)}$) shows the evolution of the optical density at 650 nm without inhibitory substance and Ei means experiment in presence of inhibitor: ($OD_{Ei(t=6h)} - OD_{Ei(t=0)}$) shows the evolution of the optical density for a definite concentration of glycerol or 1,3-PD.

Preparation of cell free extracts. Cells grown on 60 g of glycerol per liter from a fermentor were centrifuged at 12,000 x g for 15 min; after washing (except for Hydrogenase activity), cells were resuspended in Tris buffer (50 mM Tris-HCl; 2.0 mM DL-dithiothreitol; 0.1 mM MnSO₄ [pH 7.4]). 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); this cycle was repeated four times. The supernatant was collected from the cell lysate by centrifugation at 12,000 x g for 20 min at 4 °C. At each step, extracts were maintained in anaerobic conditions.

Protein concentrations of cell extracts were determined by the method of Bradford (8) with crystalline bovine serum albumin as the standard.

Enzyme assays :

Hydrogenase (EC 1.12.7.1) in the direction of methyl viologen reduction was assayed as described by Junelles *et al.* (15), modified as follows : 60 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2); 20 mM methyl viologen; 140 mM β-mercaptoethanol under a hydrogen atmosphere.

Ferredoxin-NAD reductase was assayed with pyruvate as the reductant of ferredoxin and under a carbon monoxide atmosphere by the method of Petitdemange *et al.* (22), modified by the addition of 1 mM purified ferredoxin (Sigma chimie, St Quentin Fallavier, France).

NADH-ferredoxin reductase was measured by the metronidazole reduction according to the method of Blusson *et al.* (6).

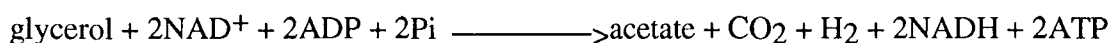
Glycerol and 1,3-propanediol dehydrogenase activities were measured by the linear increase in A₃₄₀ produced by addition of cell extracts (23). The assays contained the following components: 100 mM glycerol or 1,3-propanediol; 2 mM NAD⁺; 30 mM ammonium sulfate, and 100 mM potassium carbonate buffer (pH 9.0).

Acetate kinase (EC 2.7.2.1) and **Butyrate kinase** (EC 2.7.2.7) activities, in the nonphysiological direction, were determined by measuring the rate of acetyl or butyryl-phosphate produced by the method of Lipman and Tuttle (18) at 540 nm with acetyl-phosphate

as standard. The assays contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5); 0.4 M potassium acetate or 0.4 M potassium butyrate; 6 mM manganese sulfate; 10 mM ATP. After 5 min at 37 °C, 0.7 M hydroxylamin pH 6.4 (freshly neutralized) was added. After 5 min at room temperature, 15 % TCA; 4 M HCl and 5 % FeCl₃ were added.

Phosphoroclastic activities were determined as previously described (21), modified as follows : 25 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5); 1 mM sodium pyruvate; 0.05 mM Coenzyme A; 1 mM methyl viologen.

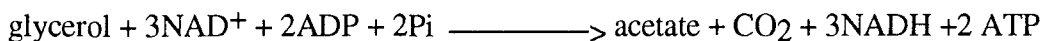
Calculations : In the glycerol catabolism, the minimum or maximum amount of NADH formed can be calculated according to the equations of glycerol conversion to acetate and butyrate :



If the reduced ferredoxin is not reoxidized by the hydrogenase but is entirely reoxidized by the ferredoxin-NAD⁺ reductase according to :

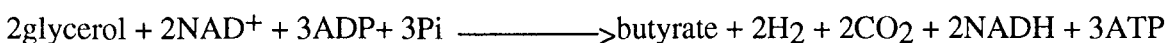


the conversion of glycerol to acetate becomes :

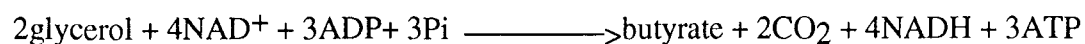


The minimum amount of NADH formed via the acetate pathway was 2 and the maximum NADH was 3, hence the corresponding production of 1,3-PD must be between 2 and 3 moles.

Conversion of glycerol to butyrate can be written as :



On the assumption that the reduced ferredoxin is entirely reoxidized by the ferredoxin-NAD⁺ reductase activity rather than being released as molecular H₂ via hydrogenase, the conversion of glycerol to butyrate becomes :



The minimum amount of NADH formed via the butyrate pathway was 2 and the maximum NADH was 4, hence the corresponding production of 1,3-PD must be between 2 and 4 moles.

RESULTS

Resistance to glycerol and 1,3-propanediol. Exposure to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) followed by selection of mutants by growth in liquid RCM supplemented with 526 mM 1,3-PD and then plating on agar medium containing glucose plus an equimolar mixture of bromide and bromate allowed us to select 14 mutants with similar properties. Three representative mutants, designated 2/2, 2/6 and 5/6 were retained, and their properties are described in this paper.

Isolated mutants were more resistant to glycerol than was the wild-type for the high concentrations used, namely above 1,630 mM (Table 1). with 1,630 mM of glycerol in the medium, the percentage of growth inhibition in the wild-type was 105 % but that in the mutants was between 38 and 72 % .

The resistance to 1,3-PD was tested (Table 1). Mutants were also more resistant than the wild-type for the concentrations of 1,3-PD used. At 395 mM 1,3-PD, the percentage of growth inhibition in the wild-type was 73 % but that in the mutants was between 12 and 21 % .

Table 1. Effect of various concentrations of glycerol and 1,3-propanediol on cellular growth

Strain	% Growth inhibition ^a at					
	glycerol concn. (mM)			1,3-PD concn. (mM)		
	1,630	1,955	2,170	260	395	525
wild	105(9)	108(7)	112(8)	33(4)	73(5)	106(7)
2/2	72(3)	87(4)	106(7)	13.0(0.3)	21(1)	83.5(2.6)
2/6	38(2)	60(3)	98(6)	6(1)	12(1)	28.5(1.3)
5/6	58(3)	74(2)	104(5)	11(1)	20.5(0.5)	35(1)

^aValues represent the mean of three determinations. Standard deviation are given in parentheses.

Fermentation products during growth on glycerol. The kinetics of growth, glycerol consumption, and product formation for the wild-type and the mutant 2/2 are shown in figures 1 and 2 respectively. The major characteristic of these mutants was their ability to produce more biomass. The maximum cell yield for the parent strain was 1.32 g/l compared with the maximum cell yield of 2.95 g/l for the mutant. Biomass was increased 2.2-fold. The generation time of the wild-type changed from 2.06 h to 1.70 h for the mutant. Table 2 and Fig. 1 and 2 show complete glycerol consumption at the end of fermentation, corresponding to the highest production of 1,3-PD. Acid formation was different for the mutant and the wild-type strains. The wild-type produced more acetic acid (155 mM) than butyrate (30.7 mM), whereas the mutants 2/2 and 5/6 produced almost the same quantities of acetic acid and butyrate (ratios from 1.07 to 0.93 respectively). Mutant 2/6 produced more butyrate than acetate (ratio 0.66 [Table 2]). Furthermore, it is worth noting that the total acid formation was higher for the wild-type strain than for the mutants.

The conversion of glycerol to 1,3-PD (moles of 1,3-PD / moles of glycerol) was almost the same : 0.61 for the wild-type and 0.634 for the mutants. The fact that the quantities of 1,3-propanediol formed were always greater than the quantities of NADH generated in the catabolic conversions from glycerol to pyruvate, i.e. minimum NADH (Table 2), suggests the existence of another source of NADH. Part of the reduced ferredoxin can be reoxidized by the ferredoxin-NAD⁺ reductase, such that 70 % NADH is available for the wild-type strain and near 97-100 % for the mutants.

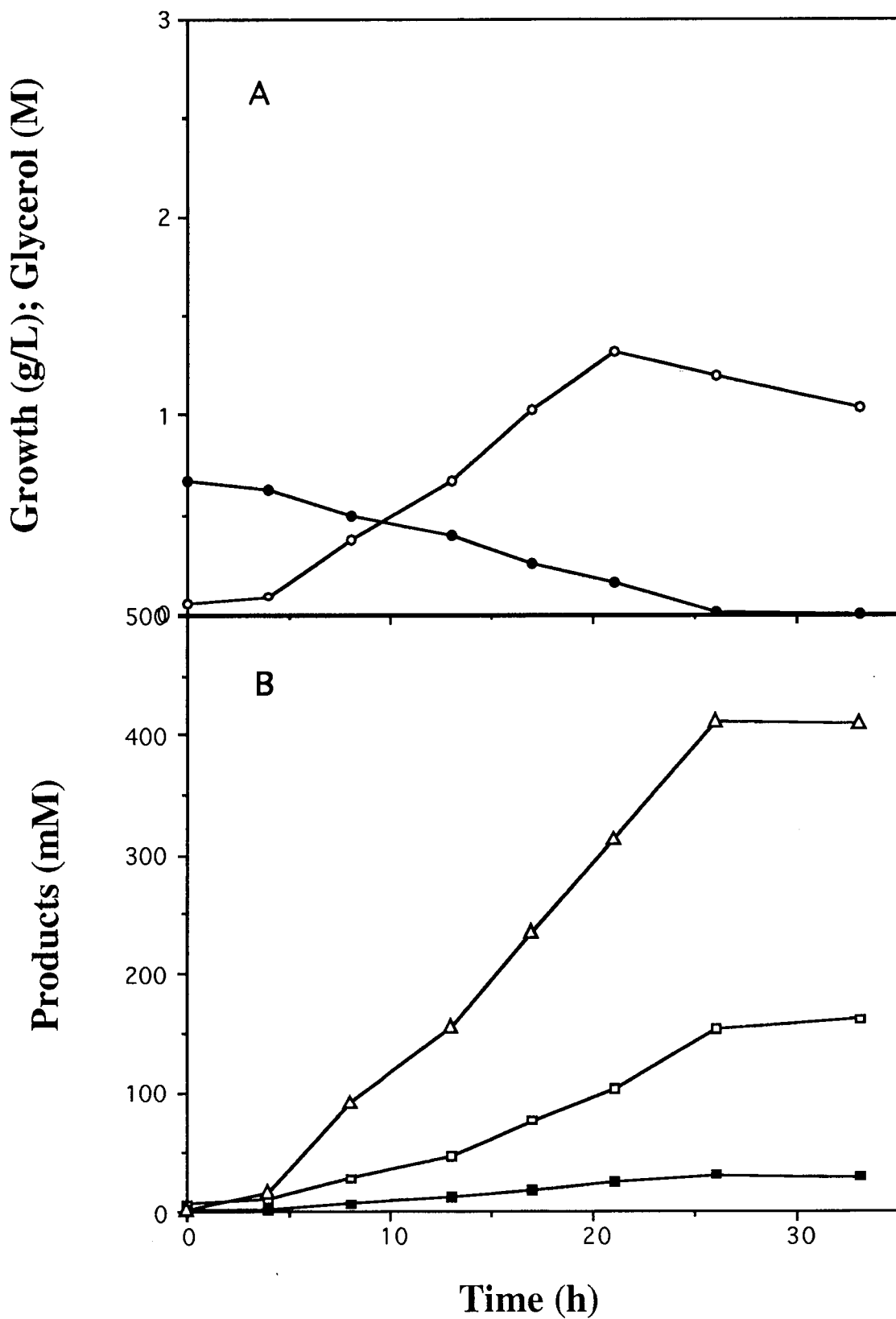


FIG. 1. *C. butyricum* DSM 5431 growth and substrate utilization (A) and product formation (B) in a culture fermentor with 62 g of glycerol per liter.

Symbols: ○ , growth; ● , glycerol; □ , acetic acid; ■ , butyric acid; Δ , 1,3-PD.

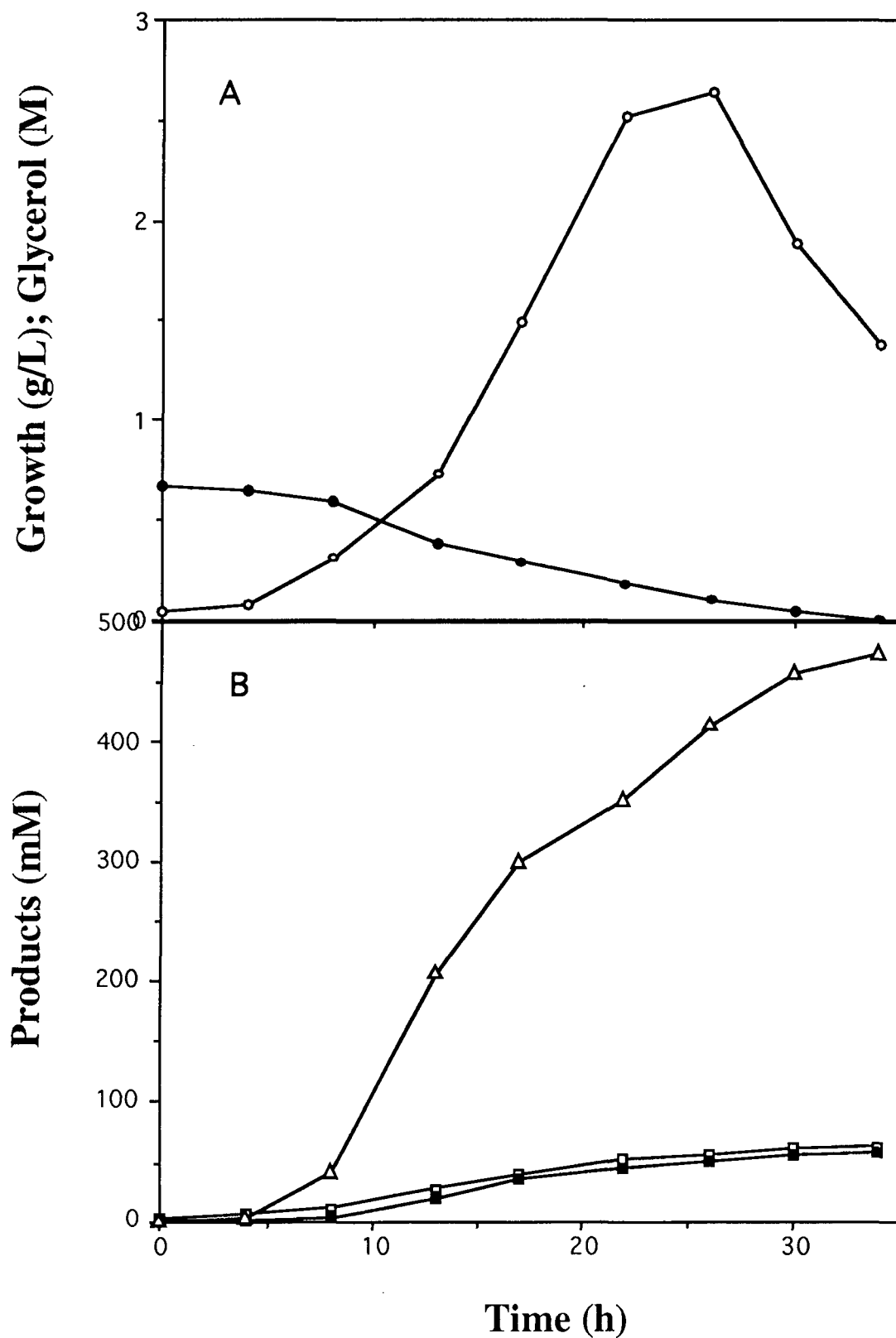


FIG. 2. Mutant 2/2 growth and substrate utilization (A) and product formation (B) in a culture fermentor with 62 g of glycerol per liter.

Symbols: ○ , growth; ● , glycerol; □ , acetic acid; ■ , butyric acid; △ , 1,3-PD.

Table 2. Fermentation data of *C. butyricum* DSM 5431 and mutants grown on glycerol (673 mM) at pH 7.0

Strain	Biomass g/l	Products (mM)					Y _{1,3 PD}	carbon recovery (%)	NADH (mmol)		NADH recovery(%)
		Acetate	Butyrate	1,3 PD	Total acids	Acetate/ Butyrate			min	max	
wild	1.32	155(16)	31.0(5.4)	411(31)	186	5	0.610	96	371	589	70
2/2	2.95	63(7)	59.0(6.5)	426(44)	122	1.07	0.633	95	244	425	100
2/6	2.04	48.3(8.6)	73.0(10)	426(32)	121.3	0.66	0.634	96	242	437	97.5
5/6	1.95	57(8)	61.0(8)	412(49)	118	0.93	0.612	92	236	415	99.2

Values represent the average of three determinations. () : Standard deviation.

In the catabolism of glycerol, the minimum amount of NADH formed via the acetate pathway was 2 and the maximum NADH was 3 on the assumption that the reduced ferredoxin was entirely reoxidized by the ferredoxin-NAD reductase activity. The NADH min produced during the butyrate pathway was 2, and 4 for the NADH max if the two reduced Fd were reoxidized by the ferredoxin-NAD reductase activity.

NADH recovery means the percentage of maximum NADH available used for the formation of 1,3 propanediol : $\frac{\text{mmol PD}}{\text{mmol NADHmax}} \times 100$

Y_{1,3 PD} (mol 1,3 propanediol produced / mol glycerol consumed).

Analysis of key metabolic enzymatic activities. Enzymatic analyses of key metabolic activities were undertaken for a 673 mM glycerol-grown batch culture of *C. butyricum* and mutants to understand more clearly the changes in enzyme activities in mutant strains. We compared the specific activities of the reaction catabolized by the mutant enzymes and the parent strain enzymes. As found by Heyndrickx *et al.*(13), dehydrogenase activities in cell extracts of *C. butyricum* DSM 5431 were NAD⁺-dependent.

Table 3 shows high glycerol dehydrogenase and 1,3-PD dehydrogenase activities in both the wild-type strain and the mutants. These activities were in the same range in the exponential phase and at the end of growth, except for the wild-type strain, in which the glycerol dehydrogenase activity decreased about 2.3 fold.

The activity of acetate kinase was maximum at the beginning of the fermentation (twofold higher than at the end of growth) for the wild-type and mutant 5/6, whereas the values were relatively constant throughout the fermentation in mutants 2/2 and 2/6. Mutants 2/6 and 5/6 showed the greatest acetate kinase activities (Table 3).

The butyrate kinase activities were increased at the end of the fermentation except for those in mutant 5/6, and the specific activities increased by a factor 1.2 for mutant 2/2 and 4 for mutants 2/6 and 5/6. Higher butyrate kinase activities (mutants 2/6 and 5/6) or lower acetate kinase activities (mutant 2/2) in cell extracts of the mutants were in accordance with a decrease in acetate production and an increase in butyrate production (Table 2).

The hydrogenase activity increased as a function of growth for the wild-type but was stable for the mutants and was markedly decreased (by a factor 5 to 20 compared with the wild-type), which explains the better use of NADH available for the mutants and a better conversion of glycerol to 1,3-propanediol (Table 2). On the other hand, the phosphoroclastic activities decreased with growth for the wild-type and increased for the mutants (Table 3). The NADH-ferredoxin reductase activities were significantly lower and the ferredoxin-NAD⁺ reductase activities were higher for the mutants than for the wild-type, allowing the transfer of the reducing equivalents from the reduced ferredoxin produced by the ferredoxin oxidoreductase to the NADH, a transfer facilitated by the low hydrogenase level.

TABLE 3. Enzymatic activities from cell extracts of glycerol (673 mM) batch culture of *C. butyricum* DSM 5431 and mutants.

Enzyme	Sp act (U/mg of proteins)									
	wild		2/2		2/6		5/6			
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
glycerol dehydrogenase	0.90 (0.16)	0.39 (0.07)	0.98 (0.17)	0.68 (0.13)	0.98 (0.19)	0.98 (0.18)	0.76 (0.14)	0.79 (0.15)		
1,3 PD dehydrogenase	1.13 (0.23)	0.92 (0.17)	1.34 (0.28)	1.04 (0.21)	1.93 (0.35)	2.49 (0.42)	1.75 (0.29)	1.12 (0.23)		
Acetate kinase	11.31 (1.43)	6.80 (0.82)	5.53 (0.67)	6.80 (0.76)	12.54 (1.53)	11.37 (1.36)	15.73 (1.92)	7.53 (0.86)		
Butyrate kinase	2.25 (0.67)	3.60 (0.75)	2.83 (0.83)	4.36 (0.87)	9.95 (1.66)	12.57 (2.15)	10.01 (2.03)	9.25 (1.52)		
Hydrogenase	0.68 (0.20)	2.05 (0.51)	0.13 (0.04)	0.10 (0.03)	0.26 (0.08)	0.24 (0.09)	0.46 (0.14)	0.44 (0.12)		
Pyruvate phosphoroclastic system	0.13 (0.04)	0.05 (0.02)	0.15 (0.06)	0.20 (0.08)	0.09 (0.03)	0.14 (0.05)	0.09 (0.02)	0.12 (0.04)		
Ferredoxin-NAD reductase	0.011	0.004	0.012	0.075	0.029	0.029	0.019	0.007		
NADH-ferredoxin reductase	0.011	0.0025	0.0027	0.0084	0.0021	0.0047	0.0031	0.0027		

One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion of 1 μ mole of substrat per minute.
 I : Exponential phase of the growth; II : End of the growth.
 () : standard deviation of three determinations.

Fed-batch culture. The values of fermentation variables obtained with the wild-type strain and mutants in fed-batch cultures are shown in Table 4. The higher tolerance of the mutants for glycerol and 1,3-propanediol results in more biomass, more glycerol consumed and more 1,3-PD formed than for the wild-type. For example, the biomass of the mutant 2/2 was increased by 63 %, the glycerol consumed was increased by 49 %, and the 1,3-PD production was increased by 58%. In the presence of a high glycerol concentration, more butyrate was formed by the wild-type strain (the acetate/butyrate ratio evolved from 5 [Table 2] to 3.4 [Table 4]) whereas the mutants increased the acetate concentration (the acetate/butyrate ratio varied from 1.3 to 2.15). At a high glycerol concentration, NADH recovery decreased for the wild-type strain and for the mutants (Tables 2 and 4); nevertheless, the NADH recovery was around 46 % higher in the mutants.

Table 4. Fermentation data of *C. butyricum* DSM 5431 and mutants grown in Fed-batch culture

Strain	Biomass g. l ⁻¹	glycerol consumed (mmol . liter ⁻¹)	Products (mmol . liter ⁻¹)			Y _{1,3 PD}	carbon recovery (%)	NADH recovery(%)
			Acetate	Butyrate	1,3 PD			
wild	2.28	949(51)	242.3(16)	71.4(6.2)	586.6(42)	0.618	102.4	58
2/2	3.72	1413.7(69)	184(14)	136.1(8.7)	928.6(73)	0.657	98	84.7
2/6	3.50	1321.9(83)	204(12)	94.8(7.4)	850.2(66)	0.643	94	85.8
5/6	2.88	1309.4(75)	193.3(11)	100.2(6.3)	847.5(83)	0.647	94.8	86.4

Values represent the average of three determinations. () : Standard deviation.

Y_{1,3 PD} (mol 1,3 propanediol produced / mol glycerol consumed).

DISCUSSION.

Previous works have shown that the growth rate of *C. pasteurianum* (26) and *C. butyricum* (5) decreased as the total osmolarity of the medium increased. The present study shows that the use of high 1,3-propanediol concentrations as the selection procedure allows selection of mutants with higher tolerance to 1,3-PD and glycerol and with altered growth characteristics. The 1,3-propanediol added to the growth medium acts as an inhibitor to growth; as might be expected, mutants which can tolerate the presence of inhibitory concentrations of 1,3-PD would have better growth characteristics, since they can overcome this impediment (i.e. produce more biomass and improve the generation time), and product tolerance. This is the case for the mutants we have selected. Mutants with similar characteristics were also obtained with *C. acetobutylicum* using n-butanol as the selective agent (20). Moreover, coupling this procedure with the proton suicide method (27) allowed us to isolate mutants altered in their acid formation pattern. In *Clostridium* species, production of acetate and butyrate is associated with hydrogen formation : the reduced ferredoxin transfers electrons to hydrogenase, which permits the use of protons as a final electron acceptor, resulting in the production of molecular hydrogen. Hence, the relative amounts of acetate and butyrate are dependent on electron acceptors e.g. hydrogenase and 1,3-propanediol dehydrogenase. The decrease in the hydrogen formation must result in a decrease in acid formation (16, 22). This suggestion is supported by the mutants obtained in this work, since the mutants produced, in batch culture on 62 g of glycerol per liter, fewer moles of acids than did the wild strain, and similar results were obtained by Cueto and Méndez (9) when selecting mutants of *C. acetobutylicum* using the proton suicide method. With a similar pKa, the switch of the acetate (pKa= 4.76) to butyrate (pKa= 4.82) led to a decrease in proton concentration. The acetate kinase and butyrate kinase activities were in accordance with the observed fermentation pattern : i.e. evolution of the acetate/butyrate ratio from 5 to 0.6-1.0, and the most prominent change was an increase in the butyrate kinase activities or a decrease in acetate kinase activities.

When clostridia are grown on a substrate more reduced than glucose, such as mannitol or glycerol, the reducing power is not used to form molecular hydrogen but is used to form more

highly reduced compounds: 1,3-PD for *C. butyricum* growing on glycerol (4, 13), butanol and 1,3-PD for *C. pasteurianum* growing on glycerol (10, 13) or mannitol (12); and butanol for *C. acetobutylicum* growing on glucose and glycerol (25). It has been suggested that part of the reduced ferredoxin produced by the pyruvate ferredoxin oxidoreductase is used to generate NADH, leading to low hydrogen production. The enzymology of these pathways has not been fully elucidated, particularly for glycerol fermentation by *C. butyricum* (13, 4). The highest NADH recovery (Table 2) obtained for the mutants can be explained by a change in the level of the hydrogenase, which was markedly decreased in the mutants. On the other hand, the decreased NADH-ferredoxin reductase level is correlated to the increased level of the ferredoxin-NAD⁺ reductase, allowing the NADH formation at the expense of hydrogen production. The different changes in the activities of NADH-ferredoxin reductase and ferredoxin-NAD reductase suggest the possibility of two separate enzymes. The existence of distinct ferredoxin-NAD⁺ oxidoreductases has also been shown for other clostridia (17, 22, 25). Nevertheless, our results indicate that *C. butyricum* regenerated the excess reducing equivalents from glycerol via the ferredoxin-NAD⁺ reductase and 1,3-propanediol dehydrogenase activity. The efficiency of this pathway was also quoted by Heyndrickx et al. (13), who mentioned that no hydrogen was produced by *C. butyricum* LMG 1212 t2 growing on glycerol, indicating that the all ferredoxin reduced was reoxidized through the formation of NADH.

The values of fermentation variables obtained in fed-batch cultures demonstrate clearly the superiority of the mutants compared to the wild-type strain. The higher biomass at the stationary phase and the higher glycerol consumption considerably improved the 1,3-PD production. Nevertheless acetate/butyrate ratios varied in the presence of high glycerol concentrations, as already observed in *Clostridium butyricum* growing on glycerol (3).

ACKNOWLEDGEMENTS.

The authors wish to thank Dr. H. BIEBL and Ms A. REIMANN for helpful discussions. We thank E. McRAE for critical reading of the manuscript and improvement of the English.

This work was supported by the commission of the European communities AAIR programme : Contrat N° AIR 2-CT93-0825 (DG 12 SSMA).

REFERENCES

1. **Abeles, R.H., A.M. Brownstein, and C.H. Randles.** 1960. β -hydropropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-propanediol by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta.* **41**:530-531.
2. **Ballongue, J. , E. Masion, J. Amine, H. Petitdemange, and R. Gay.** 1987. Inhibitor effect of products of metabolism on growth of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**:568-573.
3. **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.
4. **Biebl, H. ,S. Marten, H. Hippe, and W.D. Deckwer.** 1992. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated Clostridia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:592-597.
5. **Biebl, H., and N. Pfenning.** 1981. 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.
6. **Blusson, H., H. Petitdemange, and R. Gay.** 1981. A new, fast, and sensitive assay for NADH-ferredoxin oxidoreductase detection in Clostridia. *Anal. Biochem.* **110**:176-181.
7. **Boenigk, R., S. Bowien, and G. Gottschalk.** 1993. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:453-457.
8. **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
9. **Cueto, P.H. and B.S. Méndez.** 1990. Direct selection of *Clostridium acetobutylicum* fermentation mutants by a proton suicide method. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:578-580.
10. **Dabrock, B., H. Bahl, and G. Gottschalk.** 1992. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**:1233-1239.
11. **Forsberg, C.W.** 1987. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other species. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:639-643.

- 12 Heyndrickx, M. , P. De Vos, and J. Deley.** 1991. Fermentation characteristics of *Clostridium pasteurianum* LMG 3285 grown on glucose and mannitol. *J. Appl. Bacteriol.* **70**:52-58.
- 13. Heyndrickx, M. , P. De Vos, M. Vancanneyt, and J. Deley.** 1991. The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212 t2 and 1213 t1 and *Clostridium pasteurianum* LMG 3285. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**:637-642.
- 14. Homann, T., C. Tag, H. Biebel, W.D. Deckwer, and B. Schink.** 1990. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**:121-126.
- 15. Junelles, A.M., R. Janati-Idrissi, H. Petitdemange, and R. Gay.** 1988. Iron effect on acetone-butanol fermentation. *Curr. Microbiol.* **17**:299-303.
- 16. Kim, B.H., P. Bellows, R. Datta, and J.G. Zeikus.** 1984. Control of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* fermentations: utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhance butanol yields. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:764-770.
- 17. Lamed, R., and J. G. Zeikus.** 1980. Ethanol production by thermophilic bacteria : relationship between fermentation product yields and catabolic enzyme activities in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii*. *J. Bacteriol.* **144**:569-578.
- 18 Lipmann, F., and L.C. Tuttle.** 1945. A specific micro-method for determination of acyl-phosphates. *J. Biol. Chem.* **159**:21-28.
- 19. Matin, A.** 1992. Genetics of bacterial stress response and its applications. *Ann. N. Y. Aca. Sci.* **665**:1-15.
- 20. Matta-el-Ammouri, G. , R. Janati-Idrissi, J. M. Rambourg, H. Petitdemange, and R. Gay.** 1986. Acetone butanol fermentation by a *Clostridium acetobutylicum* mutant with high solvent productivity. *Biomass*, **10**:109-119.
- 21. Mortenson, L.E., R.C. Valentine, and J.E. Carnahan.** 1963. Ferredoxin in the phosphoroclastic reaction of pyruvic acid and its relation to nitrogen fixation in *Clostridium pasteurianum*. *J. Biol. Chem.* **238**:794-800.
- 22. Petitdemange, H., C. Cherrier, G. Raval, and R. Gay.** 1976. Regulation of the NADH-ferredoxin oxidoreductases in Clostridia of butyric group. *Biochim. Biophys. Acta.* **421**:334-347.

- 23. Ruch, F.E, J. Lengeler, and E.C. Lin.** 1974. Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. J. Bacteriol. **119**:50-56.
- 24. SEBALD, M.** 1992. Mutations. In : Genetics and Molecular Biology of anaerobic Bacteria. M. SEBALD ed., p 64-97. Springer-Verlag, New York.
- 25. Vasconcelos, I., L. Girbal, and P. Soucaille.** 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.
- 26. Walter, R.P., J. G. Morris, and D.B. Kell.** 1987. The roles of osmotic stress and water activity in the inhibition of the growth, glycolysis and glucose phosphotransferase system of *Clostridium pasteurianum*. J. Gen. Microbiol. **133**:259-266.
- 27. Winkelman, J.W. , and D.P. Clark.** 1984. Proton suicide : general method for direct selection of sugar transport and fermentation defective substrates. J. Bacteriol. **160**:687-690.

III.3. Conclusion.

Les mutants obtenus en combinant les pressions de sélection telles que la résistance aux produits et à de fortes concentrations en bromure et bromate montrent des caractéristiques très similaires :

- ils produisent plus de biomasse que la souche sauvage; résultat de la plus grande résistance au 1,3-PD.

- 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 pas d'hydrogène puisque le recouvrement en NADH varie entre 97 et 100% du NADH maximal produit alors qu'il est de 70 % pour la souche sauvage. L'activité spécifique de l'hydrogénase a diminué d'un facteur 5 à 10 par rapport à la souche sauvage. Contrairement à ce que nous pouvions attendre, l'hydrogène qui n'est pas dégagé ne profite pas à la production du 1,3-propanediol mais à la biosynthèse du butyrate puisque la bioconversion du glycérol en 1,3-propanediol (mole / mole) ne varie pas d'une façon significative.

En accord avec les propriétés de résistance améliorées vis-à-vis du 1,3-PD, les cultures en fed-batch montrent que les mutants augmentent leur consommation en glycérol de 44 % et leur production en 1,3-propanediol de 50 % comparativement à la souche sauvage.

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-PD de l'ordre de 65-70 g/l.

IV. RECHERCHE DE MUTANTS DE *C. BUTYRICUM* RÉSISTANTS À L'ALCOOL ALLYLIQUE.

IV.1. Introduction.

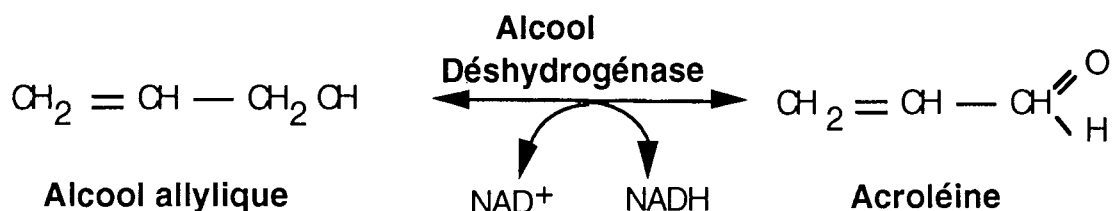
Lors de l'étude du flux carboné en chemostat chez *Clostridium butyricum*, nous avons montré que sur glycérol le premier branchement permettant la production du 1,3-propanediol et du pyruvate est très rigide puisqu'en augmentant le taux de dilution ou en obtenant des mutants qui ne dégagent plus d'hydrogène, nous n'avons pas pu augmenter la bioconversion du glycérol en 1,3-propanediol.

Nous avons ensuite essayé d'obtenir des mutants qui ne produisent plus de butyrate à partir des souches sauvages ou des mutants de résistances en recherchant des mutants qui ne développent plus sur glucose ou sur pyruvate et qui se développent sur le glycérol, en utilisant la technique d'enrichissement par la pénicilline. En effet, la voie du butyrate sur glucose ou sur pyruvate est la voie majeure de régénération du NADH en NAD⁺, elle est donc indispensable. Sur glycérol, la voie majeure de régénération du NADH est celle qui conduit au 1,3-PD; donc un mutant butyrate moins sera viable sur glycérol alors qu'il ne le sera pas sur glucose ou pyruvate. Nous n'avons pas pu isoler de mutants butyrate moins par cette méthode. Nous pouvons alors penser que le métabolisme du glycérol par *C. butyricum* repose sur un premier branchement métabolique dont il n'est pas possible de modifier le flux carboné et sur un deuxième branchement qui lui est très souple mais indispensable à la cellule pour équilibrer la répartition des éléments réducteurs ce qui expliquerait nos échecs dans la recherche d'un mutant butyrate moins.

Afin de vérifier nos hypothèses, nous avons cherché à déstabiliser ce premier branchement en sélectionnant des mutants de résistance à l'alcool allylique. Le principe de cette technique est le suivant :

La sélection de mutants de résistance à l'alcool allylique permet d'obtenir des mutants qui présentent une mutation dans la structure du gène des alcools déshydrogénases.

L'alcool allylique, en présence de NAD⁺ et d'une alcool déshydrogénase, est oxydé en acroléine, aldéhyde très toxique pour la cellule, selon la réaction :



Cette méthode de sélection est utilisée pour isoler des mutants qui :

- présentent une alcool déshydrogénase avec une structure modifiée ce qui ne permet plus à l'enzyme de transformer l'alcool allylique en acroléine.
- ne présentent plus d'activité déshydrogénase.

De tels mutants ont été isolés chez la levure (Megnet , 1967; Lutsdorf et Megnet, 1968; Wills et Phelps, 1975), chez *Escherichia coli* (Lorowitz et Clark, 1982) et chez *Clostridium acetobutylicum* (Durre et coll., 1986; Rogers et Palosaari, 1987).

IV.2. Résultats.

Les résultats des expériences de recherche de mutants de *C. butyricum* résistants à l'alcool allylique sont présentés dans l'article intitulé : "**Properties of allyl alcohol mutants of *Clostridium butyricum* grown on glycerol**".

Applied Environmental and Microbiology, 1996, 62(9), 3499-3501

PROPERTIES OF ALLYL ALCOHOL MUTANTS OF *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM*
GROWN ON GLYCEROL

Running title: *Clostridium butyricum* mutants allyl alcohol-resistant affected in acids synthesis.

S. ABBAD-ANDALOUSSI¹, J. AMINE², P. GERARD¹, E. PETITDEMANGE¹,
and H. PETITDEMANGE¹ *.

(1) Laboratoire de chimie Biologique I,
Université Henri POINCARÉ, Nancy I,
B. P. 239,
54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex
France

Tel. : 83-91-20-53

Fax. : 83-91-25-50

(2) Laboratoire de Biochimie
Faculté des Sciences
Université CHOUAIB DOUKKALI
EL JADIDA MAROC

Tel. : (212-3) 34-30-03

Fax : (212-3) 34-21-87

* Corresponding author

ABSTRACT

Four mutants of *Clostridium butyricum* E5 exhibiting resistance to allyl alcohol were isolated after nitrosoguanidine treatment. All mutants produced the same quantities of 1,3-propanediol (1,3-PD) as the wild-type strain but more acetate than butyrate (acetate/butyrate ratios from 3.8 to 4.9) whereas the wild-type produced almost the same quantities of acetic acid and butyrate (acetate/butyrate ratio of 0.95). This demonstrate that acetate-butyrate formation plays a major function in the regulation of the internal redox balance.

Allyl alcohol-resistance cannot be attributed to the loss of the 1,3-PD dehydrogenase. The apparent K_m values for the various reactions catalyzed by 1,3-PD dehydrogenase of wild-type and mutant E5-MD do not differ greatly for NAD^+ and NADH but show clearly in the mutant a decreasing K_m value for glyceraldehyde and an increasing K_m value for propanediol and allyl alcohol. This shift in the reductive properties of the enzyme was strengthened by higher NADH intracellular concentration. The fact that mutants produced more acetic acid than butyric acid may lead to increase intracellular NADH concentration, which is the coenzyme of the 1,3-PD dehydrogenase, the substrate being 3-hydroxypropionaldehyde, a very toxic compound.

The data support the view that glycerol catabolism by *Clostridium butyricum* requires 1,3-PD dehydrogenase in order to eliminate 3-HPA and all cellular regulations contribute to avoid intracellular accumulation of this compound.

INTRODUCTION

Over the past years there has been an increase in research and development efforts involving clostridial fermentations namely the branched fermentative pathways by butyric group acid bacteria (26). Among them *Clostridium butyricum* metabolizes glycerol to 1,3-propanediol (1,3-PD), acetate, butyrate, CO₂ and H₂. Although the amounts and proportions of the products formed have been extensively studied, namely in *C. butyricum* DSM 5431 (5, 6, 13, 14) nothing is known about how the oxidation-reduction state will be balanced during glycerol catabolism. Such studies would be greatly facilitated by mutants that show altered regulatory properties in carbon flux. Fermentative conversion of glycerol into end-products involve two branch points, the first divides the carbon flux towards 1,3-PD and pyruvate biosynthesis, the second towards butyrate and acetate.

In a previous investigation we found *Clostridium butyricum* mutants producing less total acid than the wild-type strain but with a decrease in the acetate/butyrate ratio which change from 5 for the wild-type to 0.6-1.0 for the mutants (2). The hydrogenase was markedly decreased (by a factor 5 to 20) in the mutants and the hydrogen production was almost suppressed (4), allowing NADH formation at the expense of hydrogen production. Surprisingly the conversion of glycerol to 1,3-PD was almost the same for the wild-type and for the mutants. This demonstrated that the excess of NADH was used only to produce butyrate and that only the branch point implicated in acetate-butyrate formation was used in the regulation of carbon flux and of the internal redox balance. To understand the signals that regulate the pathways in this fermentation, the aim of this work was to select mutants affected in the path leading to 1,3-PD production and to know how the carbon flux will be balanced. The 1,3-PD biosynthesis occurs via glycerol dehydratase and 1,3-PD dehydrogenase with 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) as intermediate compound. Treatment with allyl alcohol (AA) was usually used as selective agent to obtain mutants in the structural genes for alcohol dehydrogenase. AA is oxidized by alcohol dehydrogenases to a toxic aldehyde, acrolein. Thus, mutant organisms that synthesize altered forms of alcohol dehydrogenase or that are deficient in this enzyme survive. Such mutants have been isolated from yeasts with partial deficiency in alcohol dehydrogenase (17)

and recently from *C. acetobutylicum* (11, 19). We report here the isolation and the properties of four AA-resistant mutants of *C. butyricum*.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals were reagent grade. Enzymes and coenzymes were obtained from Sigma chimie (St Quentin Fallavier, France). All gases used were purchased from Air Liquide (Paris, France).

Organism and medium : *C. butyricum* E5 was used. (18). The preculture medium was made in Wheaton serum vials containing the following components per liter of distilled water : glycerol, 20 g; K₂HPO₄, 1.0 g; KH₂PO₄, 0.5 g; (NH₄)₂SO₄, 2.0 g; MgSO₄. 7 H₂O, 0.2 g; CaCl₂. 2 H₂O, 15 mg; FeSO₄. 7 H₂O, 5 mg; CaCO₃, 2.0 g; yeast extract, 1.0 g; trace element solution SL7 (7), 2 ml. The growth temperature was 32 °C. This medium, without CaCO₃ and with 62 g/liter of glycerol, was used as the culture medium. An exponential culture grown in the preculture medium was used as inoculum (10 %, [vol/vol]) in a fermentor (LSL-Biolafitte, St Germain en Laye, France, 2-L growth vessel with a 1-L working volume). The culture was stirred at 100 rpm. The pH was maintained at 7.0 by the automatic addition of 2 M KOH.

Analytical methods : Glycerol was determined enzymatically via glycerol kinase, pyruvate kinase and L-lactate dehydrogenase using the test kit and instructions of Bøehringer, Mannheim, Germany. Concentrations of 1,3-propanediol, 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 by 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 analyzed with an Intersmat ICR IB Integrator.

The cell concentrations were estimated by cell dry weight measurement using a predetermined correlation between A_{650} (UV160A double-beam spectrophotometer; Shimatzu, Kyoto, Japan) and cell dry weight.

Mutagenesis and mutants selection : For mutagenesis, 9 ml of exponential-phase cells culture of *C. butyricum* E5 were treated in Hungate tubes with 1 ml of 0.1 % (wt/vol) N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) at 34 °C for 60 min. NTG is the mutagen most commonly used to obtain clostridial mutants (21), and under the conditions we used, about 1 of 100 cells survived. Following centrifugation and two washings with fresh sterile RCM, cell samples were inoculated into RCM supplemented with 108 mM glycerol (10 g/liter), and grown overnight at 34 °C. Samples of this culture (0.1 ml) were plated and spread on selective medium. For selection of allyl alcohol-resistant mutants, exponential phase cells were spread onto Petri plates containing the culture medium with 10 g/liter of glycerol supplemented with L-cysteine hydrochloride (0.75 g/liter) and agar (15 g/liter) and were exposed to 50-100 μ l of AA added to paper disks on the agar surface (diameter, 9 mm). After 48 to 72 h of incubation anaerobically (GasPak; BBL Microbiology systems, Cockeysville, Md.) at 34 °C, small colonies which appeared in the clear zones were picked into RCM medium supplemented with glycerol 1 %. Grown cells were selected again by plating onto Petri plates as described above but supplemented with different concentrations of allyl alcohol (0.5, 1, 2, 3 and 4 g/liter).

Acrolein and allyl alcohol tolerance :

Inhibition was studied by using test tubes containing 9 ml of culture medium with different concentrations of acrolein or allyl alcohol. Cultures were sown with 1 ml of inoculum and incubated at 34 °C. The optical density at 650 nm (OD_{650}) was measured after 6 hours in each tube. The percentage inhibition was determined from the following equation :

$$100 \times \frac{[(OD_{c(t=6h)} - OD_{c(t=0)}) - (OD_{Ei(t=6h)} - OD_{Ei(t=0)})]}{(OD_{c(t=6h)} - OD_{c(t=0)})}$$

Where c means control tube, such that $(OD_{c(t=6h)} - OD_{c(t=0)})$ shows the evolution of the OD_{650} without inhibitory substance, and Ei means experiment in presence of inhibitor, such that $(OD_{Ei(t=6h)} - OD_{Ei(t=0)})$ shows the evolution of the OD for a definite concentration of acrolein or allyl alcohol.

Preparation of cell extracts : Cells grown on 62 g/liter glycerol from a fermentor were centrifuged at 12,000 x g for 15 min; after washing, cells were resuspended in Tris buffer (50 mM Tris-HCl; 2.0 mM DL-dithiothreitol; 0.1 mM MnSO₄, [pH 7.4]). 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); this cycle was repeated four times. The supernatant was collected from the cell lysate by centrifugation at 12,000 x 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 method (8) with crystalline bovine serum albumin as the standard.

Enzyme assays :

Glycerol and 1,3 propanediol dehydrogenase activities were measured by monitoring the linear increase A₃₄₀ produced by the addition of cell extracts (20). The assays mixture contained 100 mM glycerol or 1,3-propanediol, 2 mM NAD⁺, 30 mM ammonium sulfate, and 100 mM potassium carbonate buffer (pH 9.0).

Acetate kinase (EC 2.7.2.1) and **Butyrate kinase** (EC 2.7.2.7) activities, in the nonphysiological direction, were determined by measuring the rate of acetyl or butyryl-phosphate produced by the method of Lipmann and Tuttle (16) at 540 nm with acetyl-phosphate as the standard. The assays contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5); 0.4 M potassium acetate or 0.4 M potassium butyrate; 6 mM manganese sulfate; 10 mM ATP. After 5 min at 37 °C, 0.7 M hydroxylamine pH 6.4 (freshly neutralized) was added. After 5 min at room temperature, 15 % trichloroacetic acid, 4 M HCl and 5 % FeCl₃ were added.

Diol dehydratase (E. C. 4.2.1.28) activity was determined by the 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) method according to Toraya *et al.* (22). This method is based on the ability of aldehyde to react with MBTH forming the azine derivatives which can be determined spectrophotometrically. The assays contained the following components: 0.2 M 1,2 propanediol; 0.05 M KCl; 0.035 M potassium phosphate buffer (pH 7.0); 15 μM adenosylcobalamin and an appropriate amount of cell extract in a total volume of 1 ml. After incubation at 37 °C for 10 min, the enzyme reaction was stopped by adding 1 ml of 0.1 M potassium citrate buffer (pH 3.6) and 0.5 ml of 0.1 % MBTH hydrochloride. After 15 min at

37 °C, 1 ml of water was added and the amount of propionaldehyde was determined from the absorbance at 305 nm. The apparent molar extinction coefficient at 305 nm for the coloured product formed from propionaldehyde in the MBTH method was $13.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Kinetic data. Km values for the substrate and coenzyme were determined from Lineweaver-Burk plots derived from the results of experiments in which a fixed concentration of substrate or coenzyme and an appropriate range of concentrations of the other reactant were used.

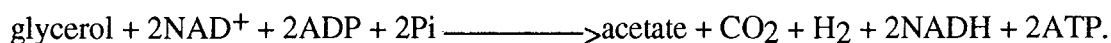
Determination of NAD⁺ and NADH pools. Levels of NAD⁺, NADH and acetyl-CoA were measured after extraction of a culture broth sample, neutralization and filtration. Samples of 4 ml were taken quickly from the bioreactor with sterile syringes and immediately put into tubes containing the extractant, without separating the cells from the medium.

NAD⁺ was extracted with HCl (NADH and NADPH were degraded), and NADH was extracted with KOH (degrading NAD⁺ and NADP⁺) as described by Wimpenny and Firth (25). Before assays for NADH, this coenzyme was converted to NAD⁺ with lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.28) (15). NAD⁺ was assayed with a NAD(H)-specific alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) (15, 24) and the resulting NADH was determined by fluorometry (Hitachi, Tokyo, Japon; model F-2000) and by spectrophotometry.

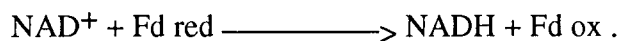
Determination of intracellular acetyl-CoA. Acetyl-CoA was extracted with perchloric acid as described by Decker (10). The level of acetyl-CoA was determined by a method described by Tubbs and Garland (23) using citrate synthase (EC 4.1.3.7) and malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37). The citrate synthase consumes oxaloacetate and acetyl-coA, and so displaces the equilibrium of the reaction catalyzed by malate dehydrogenase; thus acetyl-coA removal causes the formation of NADH₂, which may be measured spectrophotometrically.

All enzyme assays, except acetate and butyrate kinase, were performed under anaerobic conditions. Each enzyme assay was done in duplicate on three extracts. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion of 1 mmol of substrate per minute.

Calculations : In the glycerol catabolism, the minimum or maximum amount of NADH formed can be calculated according to the equations of glycerol conversion to acetate and butyrate :

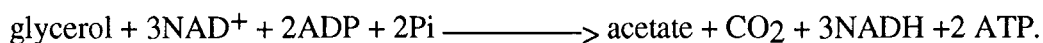


If the reduced ferredoxin is not reoxidized by the hydrogenase but is entirely reoxidized by the ferredoxin-NAD⁺ reductase according to :



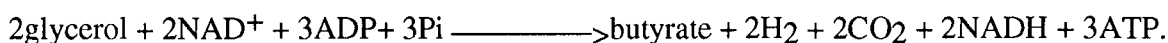
(where Fd is ferredoxin).

the conversion of glycerol to acetate becomes :

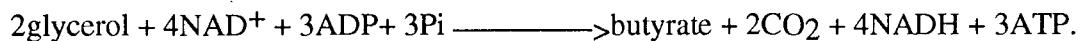


The minimum amount of NADH formed via the acetate pathway was 2 and the maximum NADH was 3, hence the corresponding production of 1,3 PD must be between 2 and 3 moles.

Conversion of glycerol to butyrate can be written as :



On the assumption that the reduced ferredoxin is entirely reoxidized by the ferredoxin-NAD⁺ reductase activity rather than being released as molecular H₂ via hydrogenase, the conversion of glycerol to butyrate becomes :



The minimum amount of NADH formed via the butyrate pathway was 2 and the maximum NADH was 4, hence the corresponding production of 1,3-PD must be between 2 and 4 moles.

RESULTS

Selection and properties of allyl alcohol-resistant mutants. After mutagenesis, *C. butyricum* E5 cells were spread onto Petri plates and exposed to paper pads with 50-100 μ l of allyl alcohol. Colonies which appeared in the clear zones were further selected onto Petri plates supplemented with different allyl alcohol solutions. Concentrations of 0.5, 1 and 2 g/liter allowed cell growth whereas 4 g/liter were totally inhibitor. A selective pressure was obtained with 3 g/liter. 15 colonies which appeared in the clear zones were picked and purified. A survey of four isolated AA-resistant mutants and their properties, along with a comparison with the parent strain is shown in Table 1. The kinetics of growth, glycerol consumption and product formation for the wild-type and mutant E5-MD are shown in figures 1 and 2 respectively. All AA-resistant mutants showed a significantly different pattern of products compared with that of the parent strain. The wild-type produced almost the same quantities of acetate and butyrate (ratio of 0.95 [Table 1 and Fig. 1]) whereas mutants produced less butyrate than acetate (acetate/butyrate ratios which varied from 3.8 to 4.9 [Table 1 and Fig. 2]). The generation time changed from 1 h 50 min for the wild-type to around 1 h 20 min for the mutants, this difference was probably due to the fact that acetate formation generates more ATP than butyrate formation allowing higher rate of growth. Concomitantly total acid formation was higher for the mutants (Table 1) than for the wild-type strain explaining the decrease in final biomass formation due to acid toxicity. Surprisingly, conversion of glycerol to 1,3-PD (moles of 1,3-PD / moles of glycerol) was almost the same for the wild-type and the mutants. Whereas 97 % of NADH is available for the wild-type strain only 62-72 % is available for the mutants (Table 1). This fact means that the NADH not used in the butyrate biosynthesis did not lead to greater formation of 1,3-PD.

Analyses of key metabolic enzymatic activities. Mutants were selected as being resistant to allyl alcohol. The toxicity of this compound depends on the reversibility of the 1,3-PD dehydrogenase, nevertheless both mutants and the wild-type strain oxidize 1,3-PD (Table 2) and allyl alcohol (Table 3). Though a decrease of 1,3-PD dehydrogenase specific activity,

AA-resistance cannot be attributed to the loss of the oxidizing activity of the enzyme. The activity of

glycerol dehydrogenase was also slightly decreased in the mutants whereas the values of the diol dehydratase were relatively constant. Higher acetate kinase activities than butyrate kinase activities were found both for the mutants and for the wild-type.

Kinetic properties of the 1,3-propanediol dehydrogenase. The apparent K_m values for the various reactions catalyzed by 1,3-PD dehydrogenase activity of wild-type and mutant E5-MD were calculated from standard Lineweaver-Burk plots and are summarized in Table 3. Because 3-HPA is not commercially available, we used glyceraldehyde which was shown to be another substrate of the 1,3-PD dehydrogenase (9). Of particular significance was the observation that allyl alcohol was always oxidized by the 1,3-propanediol dehydrogenase activity of wild-type and mutant E5-MD cell extracts. The apparent K_m values with NAD^+ and $NADH$ do not differ greatly but show markedly different apparent K_m for glyceraldehyde and 1,3-PD. In cell extract of the mutant, the decreasing K_m for glyceraldehyde and the increasing K_m for 1,3-PD were what one would expect with an enzyme primarily concerned with the reduction of an aldehyde to alcohol. This shift in excretion may be strengthened by higher $NADH$ intracellular concentration in the mutant (Table 4).

The effect of added acrolein on the growth medium of the wild-type and of the mutant E5-MD is shown in Fig. 3. The mutant was more resistant than strain E5; the addition of 2 mM acrolein allowed full growth of mutant whereas the wild-type exhibited a growth inhibition near 50 % (Fig. 3A). At 175 mM of allyl alcohol the inhibition of growth for *Clostridium* E5 was 80 % whereas it was 20 % for the mutant (Fig. 3B).

Comparison of NAD^+ , $NADH$ and acetyl-CoA levels. In the AA-resistant strains the total $NAD^+ + NADH$ level increased sharply whereas the variations of the $NADH/NAD^+$ ratios were not significant (Table 4). The fact that the quantities of butyrate decreased in the mutants correlates with an increase in the acetyl-CoA level.

Table 1. Fermentation data of *C. butyricum* E5 and mutants grown on glycerol (673 mM) at pH 7.0

Strain	Biomass (g/l)	concn of products (mM) ^a				Acetate/ Butyrate ratio	Y _{1,3 PD} ^b	Carbon recovery (%)	concn of NADH (mmol) ^c		NADH recovery (%) ^d
		Acetate	Butyrate	1,3 PD	Total acids				min	max	
wild-type	1.62	60.7 (5)	63.6 (5.4)	423 (31)	106.6	0.95	0.609	90.8	248.6	436.5	96.9
E5-MB	1.15	147.7 (14)	33.3 (3)	415 (44)	181.0	4.43	0.616	93.5	362	576.3	72
E5-MC	1.19	163.3 (12)	34.1 (4)	425 (32)	197.4	4.79	0.631	97.5	394.8	626.3	67.8
E5-MD	1.26	166.1 (10)	43.1 (4)	422 (39)	209.2	3.85	0.627	100.2	418.4	670.7	62.9
E5-MG	1.21	165.6 (12)	35.8 (3)	413 (35)	201.4	4.62	0.613	96.6	402.8	640	64.5

^a Values represent the average of three determinations. Standard deviation are given in parentheses.

^b Y_{1,3 PD} (mol 1,3 propanediol produced / mol glycerol consumed).

^c In the catabolism of glycerol, the minimum amount of NADH formed via the acetate pathway was 2 and the maximum NADH was 3 on the assumption that the reduced ferredoxin was entirely reoxidized by the ferredoxin-NAD reductase activity. The NADH min produced during the butyrate pathway was 2, and 4 for the NADH max if the two reduced Fd were reoxidized by the ferredoxin-NAD reductase activity.

^d NADH recovery means the percentage of maximum NADH available used for the formation of 1,3-PD : (mmol of 1,3-PD/mmol of NADH_{max}) X 100

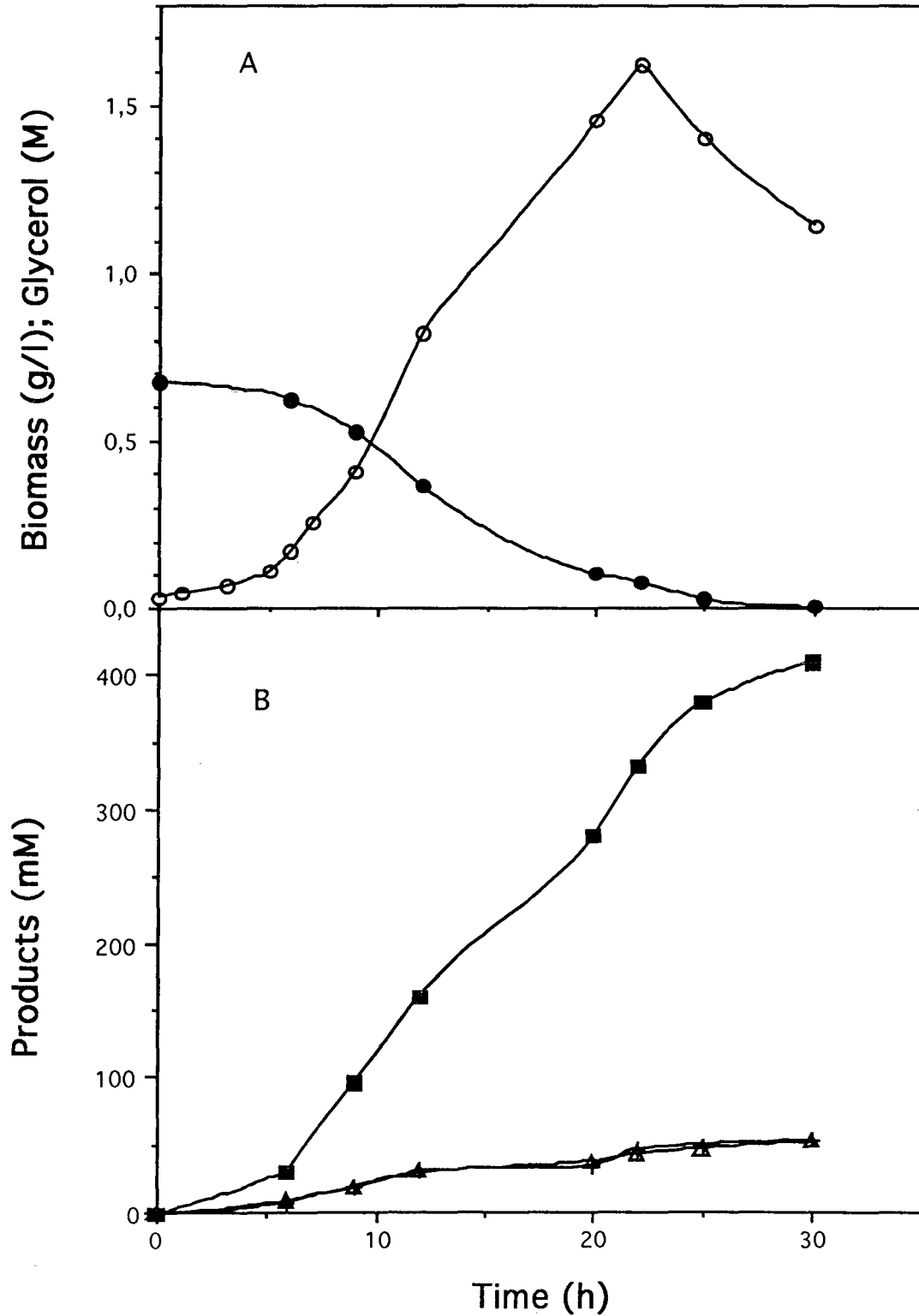


FIG. 1. *C. butyricum* E5 growth and substrate utilization (A) and product formation (B) in a culture fermentor with 62 g of glycerol per liter.

Symbols: ○ , growth; ● , glycerol; △ , acetic acid; + , butyric acid; ■ , 1,3-PD.

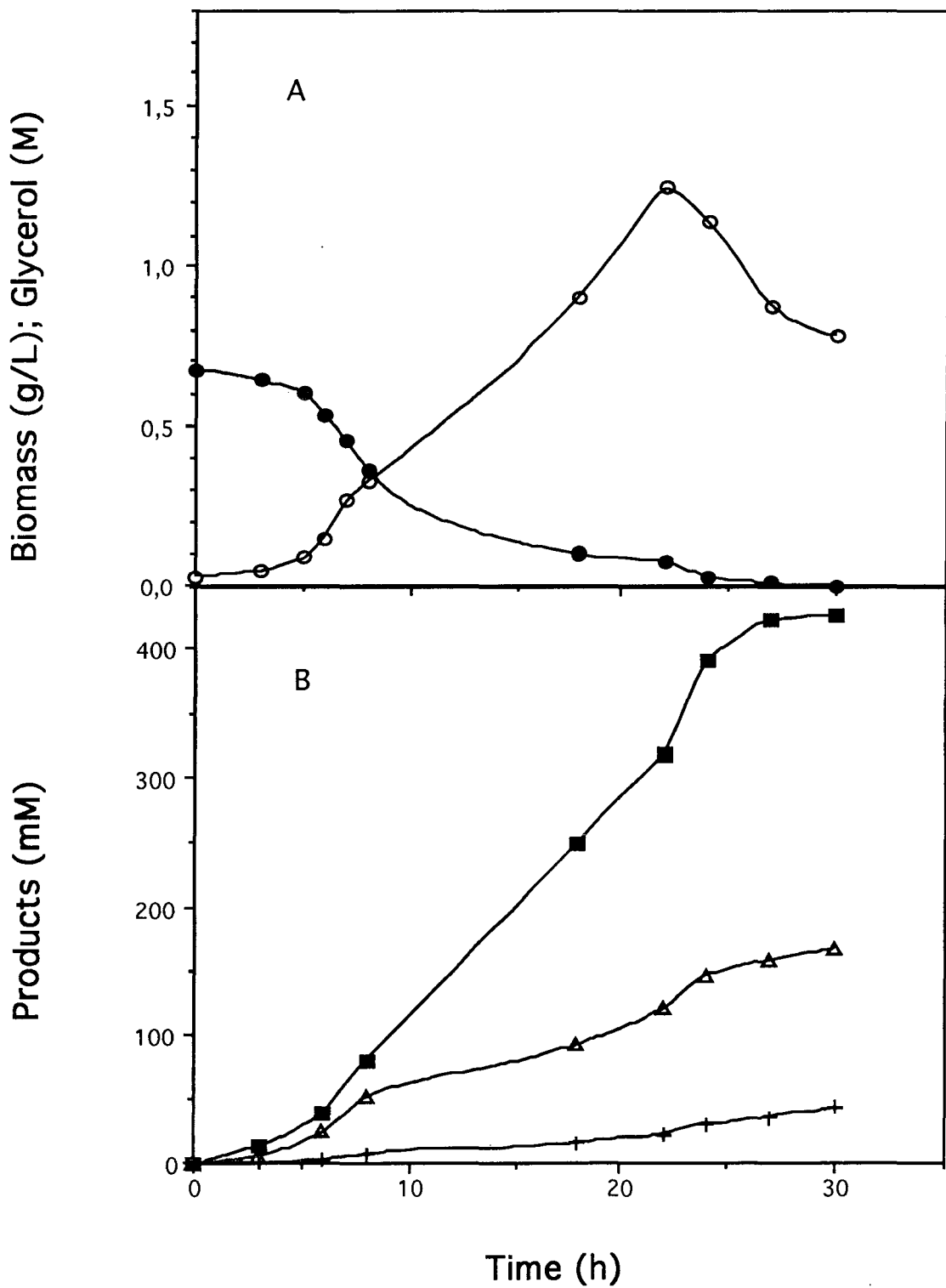


FIG. 2. Mutant E5-MD growth and substrate utilization (A) and product formation (B) in a culture fermentor with 62 g of glycerol per liter.

Symbols: ○ , growth; ● , glycerol; △ , acetic acid; + , butyric acid; ■ , 1,3-PD.

Table 2. Enzymatic activities from cell extracts of 673 mM glycerol batch culture of *C. butyricum* E5 and mutants.

Enzyme	Strain	Sp act (U/ mg of proteins) ^a for :					
		E5		E5-MD		E5-M C	
		I	II	I	II	I	II
Glycerol dehydrogenase		0.53 (0.11)	0.48 (0.10)	0.29 (0.06)	0.32 (0.08)	0.21 (0.04)	0.38 (0.07)
1,3-PD dehydrogenase		0.99 (0.22)	0.50 (0.12)	0.32 (0.06)	0.30 (0.05)	0.35 (0.08)	0.31 (0.07)
Diol dehydratase		0.11 (0.03)	0.08 (0.02)	0.09 (0.02)	0.10 (0.03)	0.07 (0.01)	0.13 (0.04)
Acetate kinase		11.5 (2.8)	8.9 (2.5)	12.7 (3.1)	13.9 (3.3)	14.3 (3.7)	13.4 (3.5)
Butyrate kinase		2.4 (0.7)	4.2 (0.9)	3.9 (0.8)	3.6 (0.7)	2.4 (0.6)	2.7 (0.7)

^a One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion of 1 μ mol of substrat per min.
 I : Exponential phase of the growth; II : End of the growth. Standard deviation (of three determinations) are given in parentheses.

Table 3. Determination of K_m values for substrates and coenzymes of 1,3-propanediol dehydrogenase.

Substrate or Coenzyme tested	other reactant	K_m (mM) ^a			
		E5	E5-MD	E5-MB	E5-MG
Allyl alcohol	2 mM NAD ⁺	3.9 (0.9)	6.1 (1.1)	-	-
NAD ⁺	100 mM Allyl alcohol	0.26 (0.05)	0.29 (0.09)	-	-
1,3-PD	2 mM NAD ⁺	6.8 (1.2)	11.7 (2.5)	11.0 (3)	14.3 (3.8)
NAD ⁺	100 mM 1,3-PD	0.21 (0.06)	0.22 (0.08)	0.19 (0.04)	0.36 (0.05)
Glyceraldehyde	0.7 mM NADH	118.8 (29)	19.0 (3.9)	39.1 (7.8)	34.2 (6.0)
NADH	500 mM glyceraldehyde	0.11 (0.03)	0.10 (0.03)	0.11 (0.05)	0.25 (0.07)

^a K_m values were calculated by non linear regression to the Michaelis-Menten equation using the curve Fit feature of the program Grafit (Erithacus Software). Standard deviation (of three determinations) are given in parentheses.

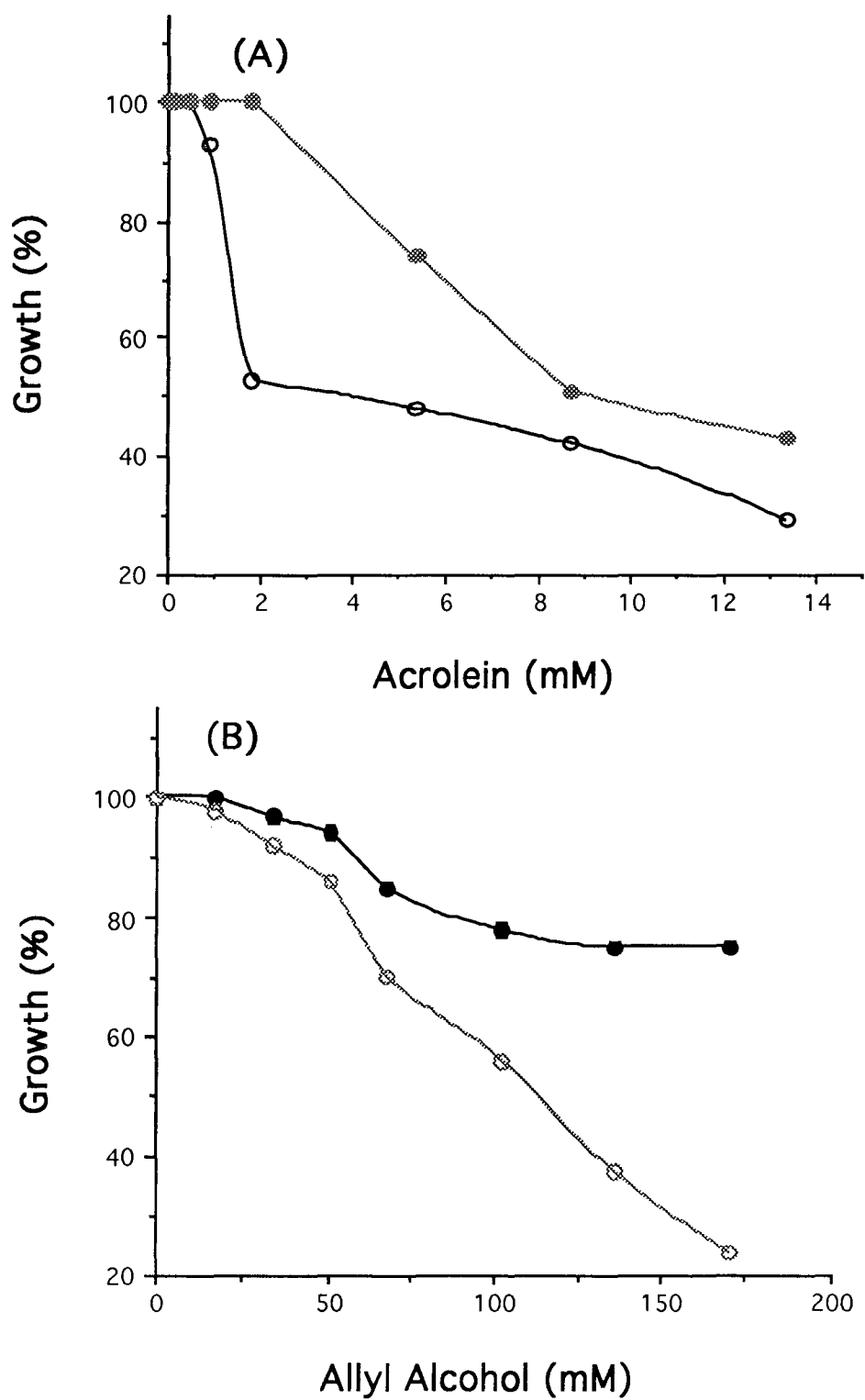


FIG. 3. Inhibition of growth of *C. butyricum* E5 and mutant E5-MD by acrolein (A) and by allyl alcohol (B).

Symbols: ○ , strain E5; ● , mutant E5-MD.

Table 4. Nucleotide levels of *C. butyricum* E5 and mutants grown in batch culture on glycerol (673 mM) at pH 7.0^a.

Strain	Nucleotide concn. (mmol . g ⁻¹ [dry mass] of cells)				
	NAD ⁺	NADH	NAD ⁺ + NADH	NADH/NAD ⁺	Acetyl-CoA
Wild-type					
I	5.8 (0.7)	13.0 (1.5)	18.8	2.3 (0.5)	7.4 (0.9)
II	4.8 (0.5)	15.9 (1.6)	20.7	3.3 (0.7)	4.0 (0.5)
E5-MC					
I	15.3 (1.3)	27.7 (2.5)	43.0	1.8 (0.3)	11.3 (1.3)
II	11.7 (1.1)	21.9 (2.0)	33.6	1.9 (0.3)	11.9 (1.4)
E5-MD					
I	17.0 (0.9)	24.9 (2.3)	41.9	1.4 (0.4)	11.8 (1.4)
II	11.5 (0.5)	18.6 (1.9)	30.1	1.6 (0.2)	14.6 (1.6)

^aEach value is the mean \pm SD of six determinations from three separated cultures measured by fluorometric method. I : Exponential phase of the growth; II : End of the growth.

DISCUSSION

The selection of mutants of *Clostridium butyricum* E5 by allyl alcohol has been used as a tool to isolate mutants that have lost the capacity to synthesize 1,3-PD. In fact, all mutants tested have been shown to produce the same quantities of 1,3-PD than the wild-type strain. Previous analyses of AA-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* (12) have identified three types of changes that conferred resistance (i) a decrease in the NAD⁺/NADH ratio, (ii) an increase in the K_m of the alcohol dehydrogenase for allyl alcohol, (iii) the loss of particular alcohol dehydrogenase isozyme. Unlike *S. cerevisiae* AA-resistant mutants of *C. butyricum* E5 contained almost the same NADH/NAD⁺ ratios but contained higher concentration of NADH and the 1,3-PD dehydrogenase exhibited a decrease in the apparent K_m for glyceraldehyde and an increase in the K_m for 1,3-PD. These changes are consistent with mutagenic events leading to increase aldehyde reduction and to decrease alcohol oxidation.

In *Clostridium acetobutylicum*, two groups of mutants which were resistant to allyl alcohol were characterized (19). Type I AA-mutants produced butyraldehyde instead of butanol and have most likely altered alcohol dehydrogenase. Type II AA-mutants produced no significant butyraldehyde but low amounts of all solvents and contained very low specific enzyme activities of butanol dehydrogenase, suggesting that they are regulatory mutants.

The AA-mutants described here were quite different, all produced normal amounts of 1,3-PD. It is most likely that glycerol catabolism by *Clostridium butyricum* requires 1,3-PD dehydrogenase activity to avoid intracellular accumulation of 3-HPA a very toxic compound(3). In addition to the changes of the 1,3-PD dehydrogenase, the fact that mutants produced more acetic acid than butyric acid lead to increase intracellular NADH concentration which confer increased protection of the cell toward 3-HPA. Table 4 shows that NADH and acetyl-CoA were not limiting substrate in butyrate biosynthesis since high concentration of these two compounds were found suggesting the presence of mechanisms that precisely partition the carbon flow between acetate and butyrate formation.

The fact that the NADH which was not used in the butyrate biosynthesis could not increase 1,3-PD formation is consistent with the results of our previous report showing that diol dehydratase

activity was the limiting step in 1,3-PD production (1). In the same view, the mutant isolated with markedly decreased hydrogenase activity (2) allowing NADH formation at the expense of hydrogen production, used the excess of NADH to produce butyrate and not 1,3-PD showing once more that 3-HPA is the limiting substrate of 1,3-PD dehydrogenase and that only the branch point implicated in acetate-butyrate formation was used in the regulation of the internal redox balance.

ACKNOWLEDGEMENTS.

The authors wish to thank Dr. H. BIEBL and Ms A. REIMANN for helpful discussions and Mr G. RAVAL for his technical assistance. This work was supported by the commission of the European communities AAIR programme : Contrat N° AIR 2-CT93-0825 (DG 12 SSMA) and by the French "Ministère de l'Agriculture et de la Pêche", contrat n° R. 94-06.

REFERENCES

1. **Abbad-Andaloussi, S., E. Guedon, E. Spiesser, and H. Petitdemange.** 1996. Glycerol dehydratase activity: The limiting step for the 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *Letters Appl. Microbiol.* **22**:311-314.
2. **Abbad-Andaloussi, S., C. Manginot-Dürr, J. Amine, E. Petitdemange, and H. Petitdemange.** 1995. Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:4413-4417.
3. **Axelsson, L., T.C., Chung, W.J., Dobrogosz, and S.E., Lindgren.** 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2**:131-136.
4. **Biebl, H.** Personal communication.
5. **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.
6. **Biebl, H., S. Marten, H. Hippe, and W.D. Deckwer.** 1992. Glycerol conversion to 1,3 propanediol by newly isolated Clostridia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:592-597.
7. **Biebl, H., and N. Pfenning.** 1981. 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.
8. **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

9. Daniel, R., R. Boenigk, and G. Gottschalk. 1995. Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpressing of the corresponding gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:2151-2156.
10. Decker, K. 1965. Acetyl-CoA. In methods of enzymatic analysis, pp. 419-424. Edited by H. U. Bergmeyer, 2nd edn. N. Y. and London: Verlag Chemie Academic press.
11. Dürre, P., A. Kuhn, and G. Gottschalk. 1986. Treatment with allyl alcohol selects specifically for mutants of *Clostridium acetobutylicum* defective in butanol synthesis. *FEMS Microbiol. Letters.* **36**:77-81.
12. Fowler, P.W., A.J.S. Ball, and D.E. Griffiths. 1972. The control of alcohol dehydrogenase isozyme synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Biochem.* **50**:35-43.
13. Günzel, B. 1991. Mikrobielle herstellung von 1,3-propanediol durch *Clostridium butyricum* und adsorptive aufarbeitung von diolen. Ph.D. thesis. University of Braunschweig.
14. Günzel, B., S. Yonsel, and W.D. Deckwer. 1991. Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m³. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:289-294.
15. Klingenberg, M. 1965. Nicotinamide-adenine dinucleotides (NAD, NADP, NADH, NADPH) Spectrophotometric and fluorometric methods. In *Methods of enzymatic analysis*, pp. 2045-2059. Edited by Bergmeyer, H. U. 2nd ed., vol. 4. New York : Academic press.
16. Lipmann, F., and L.C. Tuttle. 1945. A specific micro-method for determination of acyl-phosphates. *J. Biol. Chem.* **159**:21-28.
17. Megnet, R. 1967. Mutants partially deficient in alcohol dehydrogenase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch. Biochem. Biophys.* **121**:194-207.
18. Petitdemange, E., C. Dürr, S. Abbad-Andalousi, and G. Raval. 1995. Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *J. Ind. Microbiol.* **15**:498-502.

- 19. Rogers, P., and N. Palosaari.** 1987. *Clostridium acetobutylicum* mutants that produce butyraldehyde and altered quantities of solvents. Appl. Environ. Microbiol. **53**:2761-2766.
- 20. Ruch, F.E., J. Lengeler, and E.C. Lin.** 1974. Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. J. Bacteriol. **119**:50-56.
- 21. Sebald, M.** 1992. Mutations. In : Genetics and Molecular Biology of anaerobic Bacteria. M. SEBALD ed., p 64-97. Springer-Verlag, New York.
- 22. Toraya, T., K., Ushio, S., Fukui, and H.P.C. Hogenkamp.** 1977. Studies on the mechanism of the adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction by the use of analogs of the coenzyme. J. Biol. Chem. **252**:963-970.
- 23. Tubbs, P.K., and P.B. Garland.** 1969. Assays of coenzyme A and some Acyl derivatives. In methods in enzymology, vol. XIII, pp. 535-551. Edited by Lowenstein J.M. New York and London: Academic press.
- 24. Vasconcelos, I., L. Girbal, and P. Soucaille.** 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.
- 25. Wimpenny, J.W.T., and A. Firth.** 1972. Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. J. Bacteriol. **111**, 24-32.
- 26. Woods, D.R.** 1993. The clostridia and biotechnology. Edited by D.R. Woods, Stoneham, MA : Butterworth-Heinemann.

IV.3. Conclusion.

Les 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 et le rapport acétate / butyrate varie de 3,8 à 4,9 alors que la souche sauvage produisait la même quantité d'acétate et de butyrate (acétate / butyrate = 0,95).

- ils produisent moins de biomasse que la souche sauvage.

- La bioconversion du glycérol en 1,3-propanediol n'a pas changé, donc le NADH qui n'est pas utilisé pour la biosynthèse du butyrate n'est pas utilisé pour la production du 1,3-propanediol.

- 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 aldéhyde (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-propanediol déshydrogénase pour les aldéhydes qui sont beaucoup plus toxiques que les alcools.

A nouveau nous constatons qu'il est très difficile de modifier les flux carbonés au niveau du premier branchement alors que les modifications de flux sont très faciles entre l'acétate et le butyrate.

Partie 4. Détermination des étapes limitantes de la fermentation du glycérol par *C. butyricum*..

V. EFFET D'UN CO-SUBSTRAT (ALDÉHYDE) SUR LA FERMENTATION DU GLYCÉROL PAR *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM*.

V.1. Introduction.

Nous avons montré dans le chapitre précédent que la croissance de *C. butyricum* sur glycérol à un taux de dilution élevé permettait :

- l'augmentation de la concentration intracellulaire en NAD + NADH
- la diminution de la biomasse
- l'augmentation du glycérol résiduel
- l'inversion du rapport acétate / butyrate.

Dans ce travail, nous avons voulu voir l'effet de l'ajout dans le milieu de culture d'un co-substrat comme le propionaldéhyde ou le DL-glycéraldéhyde, qui peuvent être des substrats pour la 1,3-propanediol déshydrogénase (Daniel et coll., 1995) ce qui nous démontrons dans le Tableau 3 de la publication intitulée "**Properties of allyl alcohol mutants of *Clostridium butyricum* grown on glycerol**"), sur la croissance de *C. butyricum* à un fort taux de dilution.

V.2. Résultats.

Les résultats des expériences de l'effet d'un co-substrat sur la fermentation du glycérol par *C. butyricum* sont présentés dans les articles intitulés :

1. "**Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSM 5431**".
2. "**Effect of NADH/NAD⁺ on the glycerol utilization by *Clostridium butyricum***".

Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSM 5431

S. Abbad-Andaloussi, E. Guedon, E. Spiesser and H. Petitdemange

Laboratoire de Chimie Biologique I, Université Henri Poincaré, Nancy I, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

GWG/325: received 20 September 1995 and accepted 8 October 1995

S. ABBAD-ANDALOUSSI, E. GUEDON, E. SPIESSER AND H. PETITDEMANGE. 1996. Glycerol catabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431 into acetate, butyrate and 1,3-propanediol (1,3-PD) was studied in chemostat culture. The fact that the intracellular concentrations of NADH ($18\text{--}22\ \mu\text{mol g}^{-1}$ dry cell mass) were extremely high suggested that the dehydratase activity was the rate limiting step in 1,3-PD formation. This limitation was proved by the addition of propionaldehyde, another substrate of propanediol dehydrogenase, into the culture medium. This resulted in an increase in (i) glycerol utilization, (ii) biomass formation and (iii) product biosynthesis.

INTRODUCTION

At the present time, yeast fermentations, production of detergents from natural fats and utilization of vegetable oils as diesel fuel, generate surplus glycerol. It is of interest to find a conversion to another chemical in more demand such as 1,3-propanediol (1,3-PD) (Eggersdorfer *et al.* 1992). The microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol is easier than the chemical conversion of acrolein to 1,3-PD. Only very recently attempts were made to evaluate the physiological performance of the two bacterial groups involved in this anaerobic conversion (enterobacteria and clostridia), but mainly from a microbiological and biochemical engineering point of view (Solomon *et al.* 1995; Deckwer 1995). To improve the production process, knowledge of the mechanism used by the micro-organism is of importance. The present study was therefore undertaken to investigate the chief factors in the metabolic pathway used by *Clostridium butyricum* to regulate product formation. *Clostridium butyricum* DSM 5431 was chosen because several investigations relating to the various events which take place during glycerol metabolism have been reported (Biebl 1991; Günzel *et al.* 1991; Biebl *et al.* 1992; Günzel 1991).

Correspondence to: Dr H. Petitdemange, Laboratoire de Chimie Biologique I, Université Henri Poincaré, Nancy I, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

MATERIALS AND METHODS

Organism and medium

Clostridium butyricum DSM 5431 was used. Spores were stored at 4°C in RCM medium (Reinforced Clostridial Medium purchased from Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK).

The preculture medium contained the following components (l^{-1}) of distilled water: glycerol, 20 g; K_2HPO_4 , 1.0 g; KH_2PO_4 , 0.5 g; $(NH_4)_2SO_4$, 2.0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15 mg; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mg; $CaCO_3$, 2.0 g; yeast extract, 1.0 g; trace element solution SL7 (Biel and Pfenning 1982), 2 ml. The growth temperature was 32°C.

Fermentation modes

Continuous cultures were carried out aseptically in a 2 l bioreactor (L.S.L.-Biolaftite, St Germain en Laye, France, 2 l growth vessel with a 1 l working volume). The temperature was controlled at 32°C and pH was controlled at 7 with $2\ \text{mol l}^{-1}$ KOH. Anaerobic conditions were maintained by sparging with nitrogen. Agitation was kept constant at 100 rev min^{-1} . The culture volume was kept constant at 1 l by automatic regulation of the culture level. The bioreactor was inoculated (10% v/v) with exponential preculture. The culture was grown in batches for 12 h before the medium flow was started at a low dilution rate. Glycerol was used in this study at two concentrations, 10 and 40 g l^{-1} .

Analytical methods

Glycerol was determined enzymatically via glycerol kinase, pyruvate kinase and L-lactate dehydrogenase using the test kit and instructions of Boehringer (Mannheim, Germany). Concentrations of 1,3-PD, acetic and butyric acids were determined by gas chromatography with a gas chromatograph (Intersmat IGC 121 FL) equipped with a flame ionization detector. Separation took place in a glass column (2 m × 2 mm i.d.) 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 programmed at 170°C, and data were analysed with an Intersmat ICR IB Integrator.

The cell concentrations were estimated by cell dry weight measurement using a predetermined correlation between absorbance at 650 nm (Shimatzu UV160A double beam spectrophotometer, Kyoto, Japan) and cell dry weight.

Determination of NAD⁺ and NADH pools

Levels of NAD⁺, NADH and acetyl-CoA were measured after extraction of a culture broth sample, neutralization and filtration. Samples of 4 ml were taken quickly from the bioreactor with sterile syringes and immediately put into tubes containing the extractant, without separating the cells from the medium.

Intracellular concentrations of NAD⁺ and NADH were measured by fluorimetric and colorimetric methods (Klingenberg 1965).

NAD⁺ was extracted with HCl (NADH and NADPH were degraded), and NADH was extracted with KOH (degrading NAD⁺ and NADP⁺) as described by Wimpenny and Firth (1972). Before assays for NADH, this coenzyme was converted to NAD⁺ with lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.28) (Klingenberg 1965). NAD⁺ was assayed with an NAD(H)-specific alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) (Klingenberg 1965; Vasconcelos *et al.* 1994) and the resulting NADH was determined by fluorimetry (Hitachi, Tokyo, Japan; model F-2000).

Determination of intracellular acetyl-CoA

Acetyl-CoA was extracted with perchloric acid as described by Decker (1965). Levels of acetyl-CoA were determined by the method described by Tubbs and Garland (1969) using citrate synthase (EC 4.1.3.7) and malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37).

RESULTS AND DISCUSSION

Cultures were carried out in a chemostat at a glycerol concentration of 40 g l⁻¹ (Table 1). Residual glycerol was observed at the two dilution rates and acetate concentrations were superior to those of butyrate, although more butyrate was biosynthesized at *D* = 0.08 h⁻¹ (Ac/buty = 3.5) than at *D* = 0.30 h⁻¹ (Ac/Buty = 6.7). The glycerol conversion into 1,3-PD was almost the same: 0.58; however, the NADH which was not used in butyrate biosynthesis could be used to increase the 1,3-PD formation. The constancy of the conversion of glycerol into 1,3-PD which occurs via glycerol dehydratase and 1,3-PD dehydrogenase has been reported elsewhere (Günzel, 1991; Günzel *et al.* 1991) and suggests the presence of mechanisms that precisely partition the carbon flow between acetate-butyrate and 1,3-PD formation.

Table 2 shows that NADH and acetyl-CoA were not limiting substrates in butyrate biosynthesis since high concentrations of these two compounds were found. The thiolase that converts acetyl-CoA to acetoacetyl-CoA may be the bottleneck for the carbon flux through the butyrate biosynthesis since the level of the enzyme is low (data not shown). On the contrary, a significant 1,3-PD dehydrogenase activity (specific activity = 0.4 μmol min⁻¹ mg⁻¹) and high levels of intracellular NADH (Table 2) meant that 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) could limit 1,3-PD production. 3-HPA is not commercialized but, since it was shown that propionaldehyde was another substrate of the 1,3-PD dehydrogenase (Daniel *et al.* 1995), this compound was added to the culture medium. Data compiled in Table 3 show that concentrations of propionaldehyde from 320 μmol l⁻¹ to 1280 μmol l⁻¹ allowed one to increase (i) the use of the glycerol (9.5 g instead

Table 1 Growth and product formation by *Clostridium butyricum* DSM 5431 grown under non-carbon limited chemostat culture: glycerol 434 mmol l⁻¹

Rate dilution (h ⁻¹)	Biomass (g l ⁻¹)	Substrate used (mmol l ⁻¹)	Products (mmol l ⁻¹)			Ac/But ratio	Conversion (mol mol ⁻¹)	Carbon recovery (%)
			Acetate	Butyrate	1,3-PD			
0.08	1.1 (0.1)	364 (18)	82 (4)	23 (1)	211 (10)	3.5	0.58	93
0.30	0.77 (0.08)	190 (10)	47.5 (2.5)	7.1 (0.4)	111 (5)	6.7	0.58	91

Standard deviation of four determinations in parentheses.

Table 2 Nucleotide levels of continuous steady state of *Clostridium butyricum* grown on glycerol 434 mmol l⁻¹

Rate dilution (h ⁻¹)	Concentration of intracellular (μmol g ⁻¹ dry cell mass)			
	NAD ⁺	NADH	NADH/NAD ⁺	Acetyl-CoA
0.08	8.6 (0.5)	18.1 (0.9)	2.1	10.3 (0.7)
0.30	9.7 (0.6)	22.8 (1.3)	2.3	21.1 (1.2)

Each percentage is the mean ± S.D. of six determinations from three separated cultures measured either by colorimetric or fluorimetric methods.

Table 3 Action of propionaldehyde on *Clostridium butyricum* DSM 5431 growth in chemostat culture on glycerol (10 g l⁻¹) at dilution rate of 0.3 h⁻¹

Concentration of propionaldehyde (μmol l ⁻¹)	Biomass (g l ⁻¹)	Glycerol used (g l ⁻¹)	Products (g l ⁻¹)			Carbon recovery (%)
			Acetate	Butyrate	1,3-PD	
0	0.35	6.6	1.4	0.5	2.6	94
40	0.32	6.7	1.4	0.5	2.7	92
80	0.33	6.9	1.8	0.7	2.2	100
160	0.33	8.3	2.1	0.7	3.0	100
320	0.61	9.5	2.2	0.7	3.6	93
640	0.62	9.4	2.2	0.6	3.6	90
1280	0.62	8.9	2.0	0.5	3.4	87
2560	0.53	8.4	2.0	0.6	3.2	93
5120	0.45	8.3	2.1	0.8	2.8	100

of 6.6 g), (ii) biomass production (0.6 g instead of 0.35 g), (iii) 1,3-PD (3.6 g instead of 2.6 g) and acetate-butyrate formation. These results demonstrate that excess of NADH and 1,3-PD dehydrogenase activity were present in the cells and that glycerol dehydratase limited the activity of the propanediol dehydrogenase.

From these results it is apparent that the glycerol dehydratase plays a key function in glycerol catabolism by *Cl. butyricum* and that this limiting step avoids intracellular accumulation of 3-HPA, a very toxic compound (Axelsson *et al.* 1989).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Commission of the European Communities AAIR Programme: Contract No. AIR 2-CT93-0825 (DG 12 SSMA).

REFERENCES

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.
 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. and Pfenning, N. (1982) Isolation of members of the family Rhodospirillaceae. In *The Prokaryotes* ed. Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G. pp. 267-273. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
 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.
 Daniel, R., Boenigk, R. and Gottschalk, G. (1995) Purification of 1,3 propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing and overexpression of the corresponding gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 177, 2151-2156.
 Decker, K. (1965) Acetyl-CoA. In *Methods of Enzymatic Analysis* ed. Bergmeyer, H.U. pp. 419-424. New York, London: Verlag Chemie Academic Press.
 Deckwer, W.D. (1995) Microbial conversion of glycerol to 1,3 propanediol. *FEMS Microbiology Reviews* 16, 143-149.
 Eggersdorfer, M., Meyer, J. and Eckes, P. (1992) Use of renewable resources for non-food materials. *FEMS Microbiology Reviews* 103, 355-364.
 Günzel, B. (1991) Mikrobielle herstellung von 1,3-propanediol durch *Clostridium butyricum* und adsorptive aufarbeitung von diolen. PhD Thesis, University of Braunschweig.
 Gunzel, 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 m³. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36, 289-294.

- Klingenberg, M. (1965) Nicotinamide-adenine dinucleotides (NAD, NADP, NADH, NADPH) spectrometric and fluorimetric methods. In *Methods of Enzymatic Analysis* ed. Bergmeyer, H.U. pp. 2045–2059. New York: Academic Press.
- Solomon, B.O., Zeng, A.P., Biebl, H., Schliker, H., Posten, C. and Deckwer, W.D. (1995) Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. *Journal of Biotechnology* 39, 107–117.
- Tubbs, P.K. and Garland, P.B. (1969) Assays of coenzyme A and Acyl derivatives. In *Methods in Enzymology* ed. Lowenstein, J.M. pp. 535–551. New York and London: Academic Press.
- 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.
- 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.

Publication sera soumise

**Effect of NADH/NAD⁺ ratio on the glycerol utilization by
*Clostridium butyricum***

Running title: Effect of NADH/NAD⁺ ratio on the growth of *Clostridium butyricum*.

Keywords: *Clostridium butyricum*, glycerol, NADH/NAD⁺ ratio, carbon flow,
glyceraldehyde.

Subject category: Physiology and growth.

S. Abbad-Andaloussi, H. Malaoui, P. Gerard and H. Petitdemange*.

Laboratoire de chimie Biologique I,
Université Henri POINCARE, Nancy I,
B. P. 239,
54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex
France

Tel. : 83-91-20-53

Fax. : 83-91-25-50

* Corresponding author

SUMMARY

Clostridium butyricum was grown in continuous culture. The increase of the specific rate of glycerol catabolism led to increase the NADH/NAD⁺ ratio as well as the pool of NAD⁺ + NADH. The accumulation of NADH proved that its reoxidation by the 1,3-propanediol dehydrogenase was limited by the production of 3-hydroxypropionaldehyde. Addition of glyceraldehyde another substrate of the 1,3-propanediol dehydrogenase allowed to decrease the NADH/NAD⁺ ratio. Glyceraldehyde 1.5 mM gave the best effects : NADH/NAD⁺ ratio decreased from 4.4 to 2.6 and in that condition a sharp increase of the glycerol utilization was observed (106.3 mM instead 64.2 mM) and the biomass was increased twofold (0.64 g l⁻¹ instead 0.3 g l⁻¹). NADH/NAD⁺ ratios control the carbon flux through the cells. High values of this ratio limited glycerol consumption by an inhibitory effect on the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

INTRODUCTION

Clostridium butyricum, a strictly anaerobic spore-forming bacterium usually metabolize glycerol to 1,3-propanediol (1,3-PD), acetate, butyrate, CO₂ and molecular hydrogen. Part of the reduced ferredoxin was reoxidized by the ferredoxin-NAD⁺ reductase which explain that glycerol fermentation yields considerably less H₂ than CO₂ (Biebl *et al.*, 1992). The enzymes glycerol dehydrogenase, diol dehydratase and 1,3-PD dehydrogenase constitute the branch point that partition the carbon flux between the competing pathways, i.e. formation of either 1,3-PD or pyruvate. The increasing levels of these enzyme activities with increasing dilution rates (*D*) explained the constant proportion of glycerol conversion into 1,3-PD (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1996a). The same constancy in the conversion of glycerol into 1,3-PD was also observed with mutants hydrogenase negative obtained from *C. butyricum* DSM 5431 (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1995) and allyl-alcohol-resistant mutants obtained from *C. butyricum* E5 (Abbad Andaloussi *et al.*, 1996b). These facts indicate that glycerol catabolism by *C. butyricum* implicates a rigid first branch point which divides the carbon flux towards 1,3-PD and pyruvate biosynthesis and a flexible branch point implicated in acetate-butyrate formation essential for the regulation of the internal balance (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1996b). We were able to explain a higher carbon flow on glycerol than on glucose by the fact that on glucose NADH is reoxidized by butyric acid formation and the NADH-fd reductase, whereas on glycerol, NADH is reoxidized by the butyrate synthesis and by the very active 1,3-PD dehydrogenase. Nevertheless, high flux of glucose or glycerol led to high level of NAD⁺, NADH and acetyl-CoA. These high intracellular concentrations were interpreted by the fact that 1,3-PD and butyrate formation were rate-limiting step (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1996a). In the path leading to 1,3-PD a limited production of 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) was suggested (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1996a). Since 3-HPA is not commercialized but, since it was shown that glyceraldehyde (GLD) was another substrate of the 1,3-PD dehydrogenase (Daniel *et al.*, 1995), this compound was added into the culture medium in order to understand the effect of a release of a limiting step on the glycerol metabolism of *C. butyricum*.

METHODS

Chemicals. All chemicals were reagent grade. Enzymes and coenzymes were obtained from Sigma. All gases used were purchased from Air Liquide.

Organism and medium : *C. butyricum* DSM 5431 was used. The spores of the strain were stored at 4 °C in RCM medium (Reinforced Clostridial Medium purchased from Oxoid).

The preculture medium contained the following components (l distilled H₂O)⁻¹ : glycerol, 20 g; K₂HPO₄, 1.0 g; KH₂PO₄, 0.5 g; (NH₄)₂SO₄, 2.0 g; MgSO₄. 7 H₂O, 0.2 g; CaCl₂. 2 H₂O, 15 mg; FeSO₄. 7 H₂O, 5 mg; CaCO₃, 2.0 g; yeast extract, 1.0 g; trace element solution SL7 (Biebl & Pfenning, 1982), 2 ml. The growth temperature was 32 °C.

Fermentation modes : *Continuous cultures* were carried out aseptically in a 2-L bioreactor (LSL-Biolafitte, 2-L growth vessel with a 1-L working volume). The temperature was controlled at 32 °C and pH was controlled at 7 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 liter by automatic regulation of the culture level. The bioreactor was inoculated (10 %, v/v) with exponential preculture. The culture was grown in batches for 12 h before the medium flow was started at a low dilution rate (*D*). Substrate used in this study was glycerol at concentration of 10 g l⁻¹.

Analytical methods : Glycerol was determined enzymatically via glycerol kinase, pyruvate kinase and L-lactate dehydrogenase using the Bøhringer test kit and instructions. DL-Glyceraldehyde was determined by the 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) method according to Toraya *et al.* (1977). Concentrations of 1,3-PD, 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 x 2 mm i.d.) packed with chromosorb 101/80-100 mesh. Nitrogen was used as the carrier gas and n-butanol as the internal standard and the temperature of the column was 170 °C. Data were analysed with an Intersmat ICR IB Integrator.

The cell concentrations were estimated by cell dry weight measurement using a predetermined correlation between A_{650} (Shimatzu UV160A double beam spectrophotometer) and cell dry weight.

Preparation of cell free extracts : Cells were centrifuged at 12,000 x g for 15 min; after washing with Tris buffer (50 mM Tris/HCl; 2.0 mM DTT; 0.1 mM MnSO₄; pH 7.4) cells were resuspended in this buffer. The cells were sonicated at 2 °C four times for 20 s at a frequency of 20 kcycles s⁻¹, separated by 60 s (MSE, 150 watt ultrasonic disintegrator). The supernatant was collected from the cell lysate following centrifugation at 12,000 x 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 (1976) method, using crystalline bovine serum albumin as the standard.

Enzyme assays :

Glycerol dehydrogenase (EC 1.1.1.6) and 1,3-PD dehydrogenase (EC 1.1.1.202) activities were measured by the linear increase in A_{340} produced by addition of cell extracts (Ruch *et al.*, 1974). The assays contained the following components: 100 mM glycerol or 1,3-PD; 2 mM NAD⁺; 30 mM ammonium sulfate, and 100 mM potassium carbonate buffer (pH 9.0).

Diol 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 PD; 0.05 M KCl; 0.035 M potassium phosphate buffer (pH 7.0); 15 mM adenosylcobalamin and an appropriate amount of cell extract in a total volume of 1 ml. After incubation at 37 °C for 10 min, the enzyme reaction was stopped by adding 1 ml of 0.1 M potassium citrate buffer (pH 3.6) and 0.5 ml of 0.1 % MBTH hydrochloride. After 15 min at 37 °C, 1 ml of water was added and the amount of propionaldehyde was determined from A_{305} . The apparent molar extinction coefficient at 305 nm for the coloured product formed from propionaldehyde in the MBTH method was $13.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Acetate kinase (EC 2.7.2.1) and Butyrate kinase (EC 2.7.2.7). The enzymatic activities were determined by the analytical procedure for acetyl-phosphate (Lipmann & Tuttle, 1945). Enzyme activities were assayed in a volume of 0.8 ml containing (mmol): Tris-HCl buffer (pH 7.5), 40; potassium acetate or potassium butyrate, 160; manganese sulfate, 2.4; ATP, 4. The reaction

was initiated by addition of crude extract. After 5 min at 37 °C, 0.2 ml of hydroxylamine (2.1 M) pH 6.4 (freshly neutralized) was added. After 5 min at room temperature, the reaction was stopped by addition of 0.2 ml TCA (15%), 0.2 ml HCl (4 M) and 0.2 ml FeCl₃ (5% w/v in HCl 0.1 N). The amounts of acetyl hydroxamate or butyryl hydroxamate formed were determined at 540 nm by using a standard curve obtained with purified acetate kinase, since acetyl hydroxamate and butyryl hydroxamate have identical extinction coefficients (Lipmann & Tuttle, 1945).

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) activity was measured by the linear increase in A₃₄₀ produced by addition of cell extracts (Ferdinand, 1964).

Determination of NAD⁺ and NADH pools. Levels of NAD⁺, NADH and acetyl-CoA were measured after extraction of a culture broth sample, neutralization and filtration. Samples of 4 ml were taken quickly from the bioreactor with sterile syringes and immediately put into tubes containing the extractant, without separating the cells from the medium.

NAD⁺ was extracted with HCl (NADH and NADPH were degraded), and NADH was extracted with KOH (degrading NAD⁺ and NADP⁺) as described by Wimpenny & Firth (1972). Before assays for NADH, this coenzyme was converted to NAD⁺ with lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.28) (Klingenberg, 1965). NAD⁺ was assayed with a NAD(H)-specific alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) (Klingenberg, 1965; Vasconcelos *et al.*, 1994) and the resulting NADH was determined by fluorometry (Hitachi, Tokyo, Japon; model F-2000).

Determination of intracellular acetyl-CoA. Acetyl-CoA was extracted with perchloric acid as described by Decker (1965). The level of acetyl-CoA was determined by a method described by Tubbs & Garland (1969) using citrate synthase (EC 4.1.3.7) and malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37). The citrate synthase consumes oxaloacetate and acetyl-CoA, and so displaces the equilibrium of the reaction catalysed by malate dehydrogenase; thus acetyl-CoA removal causes the formation of NADH₂, which may be measured spectrophotometrically.

All enzyme assays, except acetate and butyrate kinase, were performed under anaerobic conditions. Each enzyme assay was done in duplicate on three extracts.

RESULTS AND DISCUSSION

Cultures were carried out in a chemostat at a dilution rate (D) of 0.30 h^{-1} , with glycerol concentration of 108 mM in these conditions we shown that cells were grown under carbon limitation (Abbad-Andalousi *et al.*, 1996a) (Table 1). When glyceraldehyde was added to the culture medium no residual concentration of this compound was detected proving a reduction into glycerol by the 1,3-PD dehydrogenase. The apparent K_m values for the various reactions catalyzed by 1,3-PD dehydrogenase of *C. butyricum* DSM 5431 were 3.7 and 0.36 mM for 1,3-PD and NAD^+ and 75.9 and 0.23 mM for glyceraldehyde and NADH , respectively.

Between 0.5 mM and 1.5 mM glyceraldehyde addition to the culture medium allowed to increase glycerol utilization and biomass formation. At 2 mM concentration, glyceraldehyde has an inhibitory effect. The best effect of glyceraldehyde was obtained at a 1.5 mM concentration, biomass was increased twofold (0.64 g l^{-1} instead 0.3 g l^{-1}) a direct consequence of a sharp increase of the glycerol utilization (106.3 mM instead 64.2 mM). Glyceraldehyde addition has no significant effect on the repartition of the carbon flow through the two branch points (i) we can notice only a slight increase of the glycerol conversion into 1,3-PD (from 0.58 to $0.62\text{ mol PD [mol glycerol]}^{-1}$) and (ii) a slight increase of the acetate/butyrate ratio (from 3.7 to 6.5). Glyceraldehyde addition has for the main effect to relieve the carbon flow since without this compound and with a glycerol input of 108 mM only 59% of the glycerol was used with a specific rate of utilization of $64.2\text{ mmol h}^{-1}\text{ g}^{-1}$, whereas when the glyceraldehyde increased into the medium, the use of the glycerol increase and the specific rate decreased to $46.2\text{ mmol h}^{-1}\text{ g}^{-1}$. As seen in Table 2, key enzyme activities were measured for different steady-state cultures and presented statistically the same activities for the five cultures proving no action of glyceraldehyde on enzyme biosynthesis.

The levels of NAD^+ , NADH and acetyl-CoA for the steady-state on glycerol are shown in Table 3. It is shown that in presence of glyceraldehyde the NADH/NAD^+ ratios decreased (from 4.4 to 2.3) as well as the pool of NAD^+ and NADH (from 38.6 to $27.2\text{ }\mu\text{mol [dry cell wt]}^{-1}$). Intracellular concentration of acetyl-CoA shows the same evolution (from 21.5 to $15.2\text{ }\mu\text{mol [dry cell wt]}^{-1}$). These data suggest a relation between the specific rate of glycerol

Table 1. Influence of glyceraldehyde concentrations on *C. butyricum* DSM 5431 grown in chemostat at dilution rate of 0.30 h⁻¹.

The glycerol input concentration was 108 mM

Conc. GLD. (mM)	Biomass (g/l)	GLD residual (mM)	glycerol used (mM)	Products (mM)			Y _{PD}	carbon recovery (%)	NADH recovery (%)
				acetate	butyrate	1,3 PD			
0	0.30	0	68.4 (5.7)	23.3 (2.4)	3.8 (0.4)	37.5 (3.8)	0.55	100	44.1
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	43.6
1	0.48	0	80.1 (7.5)	30.8 (3.1)	3.6 (0.3)	45.1 (4.4)	0.56	103.7	42.2
1.5	0.64	0	106.3 (9.4)	40.8 (4.1)	4.5 (0.5)	65.7 (6.6)	0.62	108.6	46.8
2	0.62	0	95.4 (8.4)	36.6 (3.7)	4.1 (0.4)	59.1 (6.1)	0.62	108.9	46.8

Data in parentheses are SD values from four determinations.

Y_{1,3 PD} (mol 1,3 propanediol produced / mol glycerol consumed).

Table 2. Effect of glyceraldehyde concentration on enzymatic activities from cell-free extracts of steady-state cultures of *C. butyricum* DSM 5431 at dilution rate of 0.30 h⁻¹.

Glyceraldehyde concn.. (mM)	Specific activity (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹)*				
	Glycerol Dehydrogenase	Glycerol Dehydratase	1,3-PD Dehydrogenase	Acetate 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)

* One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion of 1 μmol of substrate per min.

Data in parentheses are SD values from four determinations.

Table 3. Nucleotide levels of continuous steady-state of *C. butyricum* DSM 5431 at dilution rate of 0.30 h⁻¹ with glycerol as substrate.

Glyceraldehyde concn. (mM)	Nucleotide concn. [$\mu\text{mol (g dry cell wt)}^{-1}$]				
	NAD ⁺	NADH	NADH/NAD ⁺	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)

Data in parenthesis are SD from six determinations from three separated cultures measured by fluorometric method.

utilization and the pool of NAD⁺, NADH and acetyl-CoA. This was proved in Fig.1 and in Fig.2. Fig.1 shows the linearity between the specific rate of glycerol utilization and intracellular nucleotide pools when glycerol input was 108 mM and *D* increased from 0.04 to 0.30 h⁻¹. Fig.2 shows the linearity between the specific rate of glycerol utilization and intracellular nucleotide pools when *D* was 0.08 h⁻¹ and glycerol input increased from 108 to 540 mM.

The increasing levels of acetyl-CoA with the increasing specific rate of glycerol utilization underline the limits of the acetate and butyrate excretion paths and since the glyceraldehyde addition lead to decrease the specific rate of glycerol, the level of acetyl-CoA decreased concomitantly.

The high intracellular NADH/NAD⁺ ratio reported during the fermentation of glycerol by *C. butyricum* could inhibit some of the key enzymes leading to pyruvate and thereby limit the microorganism capacity to consume glycerol. To investigate this hypothesis further, the effect of the NADH/NAD⁺ ratio on GAPDH, an enzyme known to be affected by the NADH/NAD⁺ ratio in other clostridia (Lovitt *et al.*, 1988; Girbal & Soucaille, 1994) was examined.

Significant inhibition of GAPDH by the NADH/NAD⁺ ratio was observed (Fig. 3). During glycerol culture by *C. butyricum* and when glyceraldehyde was absent, the NADH/NAD⁺ ratio has been shown to be as great as 4.4, a level at which 90 % inhibition of GAPDH activity might be expected. When the concentration of glyceraldehyde was increased in the culture medium, the additional conversion of glyceraldehyde to glycerol allows to decrease the NADH/NAD⁺ ratio around 2.3-2.6 and the level of residual activity of GAPDH becomes near to 50 %. Therefore, the increase in activity of GAPDH released the carbon flux and allowed to increase (i) the use of glycerol, (ii) biomass production, (iii) 1,3-PD and acetate-butyrate formation.

From these results, it is apparent that the NADH/NAD⁺ ratios control the carbon flux through the cells, that high values of this ratio limit glycerol consumption by an inhibitory effect on the GAPDH. Surprisingly, the cells react also by increasing the pool of NAD⁺ and NADH.

ACKNOWLEDGEMENTS.

This work was supported by the commission of the European communities AAIR programme : Contrat N° AIR 2-CT93-0825 (DG 12 SSMA). We thank G. Raval for his helpful technical assistance.

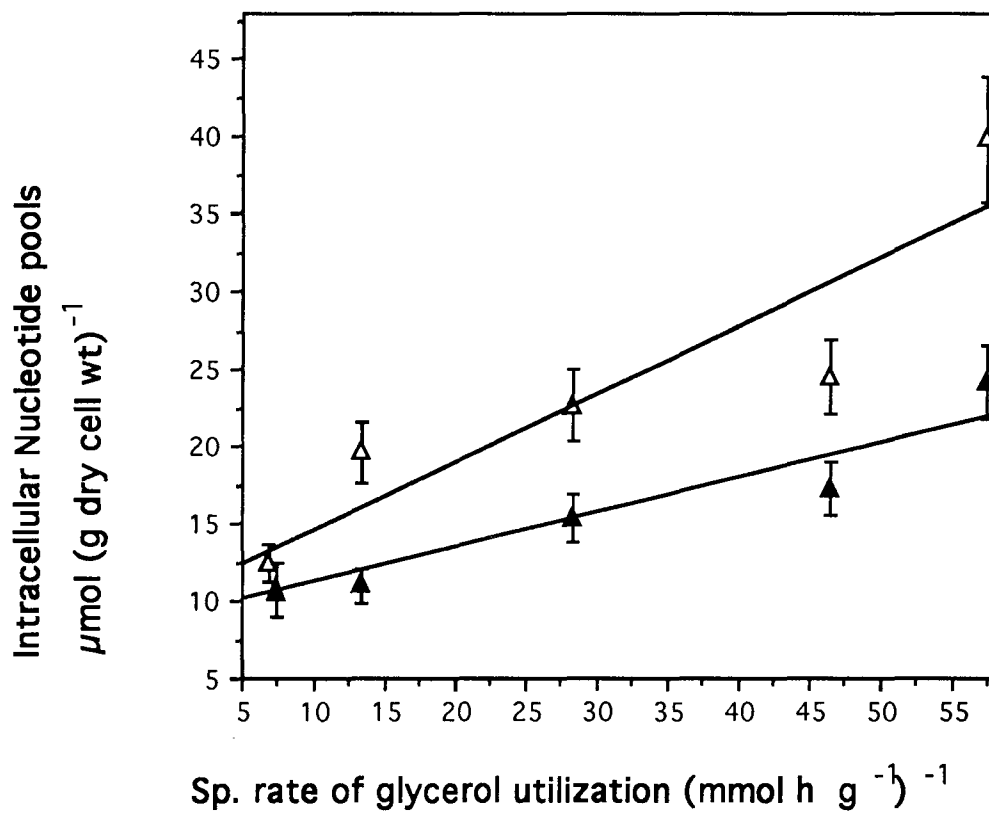


Fig. 1. Influence of the specific rate of glycerol utilization on intracellular nucleotide pools.

Glycerol input concentration was 108 mM and D increased from 0.04 h⁻¹ to 0.30 h⁻¹

△ : NAD⁺ + NADH, ▲ : Acetyl-CoA.

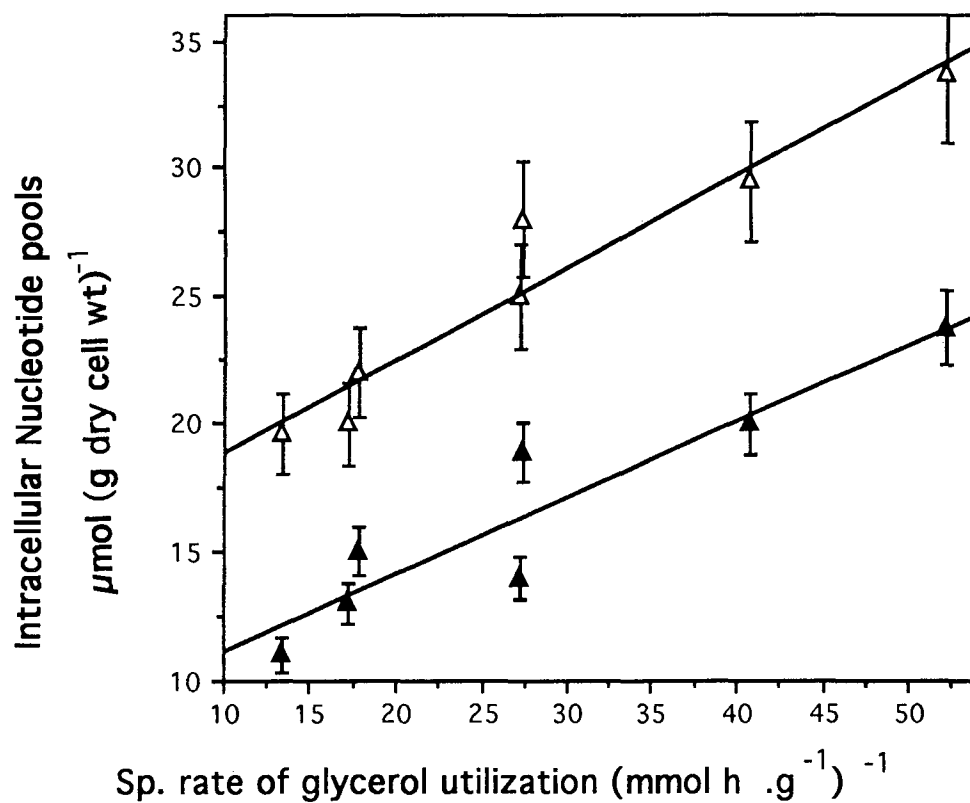


Fig. 2. Influence of the specific rate of glycerol utilization on intracellular nucleotide pools. Glycerol input concentration was increased from 108 mM to 540 mM and D was constant at 0.08 h^{-1} , Δ : $\text{NAD}^+ + \text{NADH}$, \blacktriangle : Acetyl-CoA.

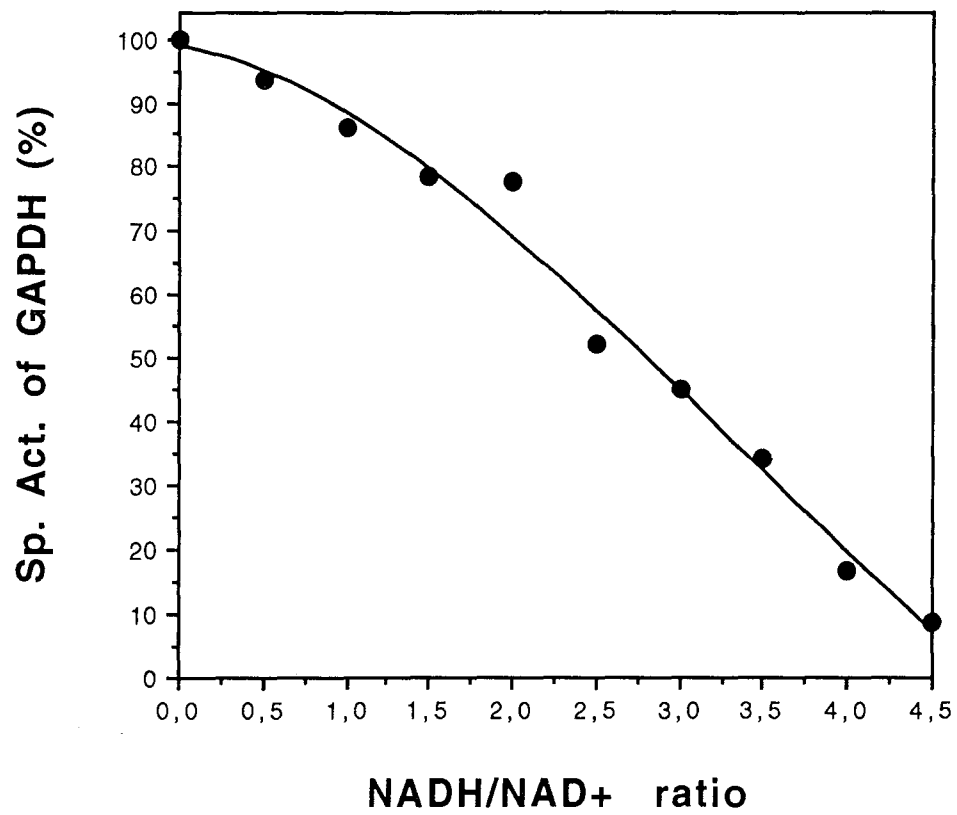


Fig. 3. Influence of the NADH/NAD⁺ ratio on the GAPDH in *C. butyricum*. The concentration of NAD⁺ was 0.1 mM.

REFERENCES

- Abbad-Andaloussi, S., C. Dürr, G. Raval, & H. Petitdemange. (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., E. Petitdemange, & H. Petitdemange. (1996b).** Properties of allyl alcohol-resistant mutants of *Clostridium butyricum* grown on glycerol. *Appl Environ Microbiol* **62**, (in press).
- Abbad-Andaloussi, S., C. Manginot-Dürr, E. Petitdemange, & H. Petitdemange. (1995).** Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4413-4417.
- Biebl, H. & Pfenning, 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.
- Biebl, H. , Marten, S., Hippe, H. & Deckwer, W.D. (1992).** Glycerol conversion to 1,3-PD by newly isolated clostridia. *Appl Microbiol Biotechnol* **36**, 592-597.
- Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Daniel, R., Boenigk, R. & Gottschalk, G. (1995).** Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpressing of the corresponding gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:2151-2156.
- Decker, K. (1965).** Acetyl-CoA. In *methods of enzymatic analysis*, pp. 419-424. Edited by H. U. Bergmeyer, 2nd edn. N. Y. and London: Verlag Chemie Academic press.
- Ferdinand, W. (1964).** The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochem J* **92**, 578-585.

Girbal, L. & Soucaille, P. (1994). Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures: role of NADH/NAD ratio and ATP pool. *J Bacteriol* **176**, 6433-6438.

Klingenberg, M. (1965). Nicotinamide-adenine dinucleotides (NAD, NADP, NADH, NADPH) Spectrophotometric and fluorometric methods. In *Methods of enzymatic analysis*, pp. 2045-2059. Edited by Bergmeyer, H. U. 2nd ed., vol. 4. New York : Academic press.

Lipmann, F. & Tuttle, L.C. (1945). A specific micromethod for determination of acyl-phosphates. *J Biol Chem* **159**, 21-28.

Lovitt, R.W., Chen, G.S., & Zeikus, J.G. (1988). Ethanol production by thermophilic bacteria: biochemical basis for ethanol and hydrogen tolerance in *Clostridium thermohydrosulphuricum*. *J. Bacteriol.* **170**, 2809-2815.

Ruch, F.E., Lengeler, J. & Lin, E.C. (1974). Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **119**, 50-56.

Tubbs, P.K. & Garland, P.B. (1969). Assays of coenzyme A and some Acyl derivatives. In *methods in enzymology*, vol. XIII, pp. 535-551. Edited by Lowenstein J.M. New York and London: Academic press.

Toraya, T., Ushio, K., Fukui, S. & Hogenkamp, H.P.C. (1977). Studies on the mechanism of the adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction by the use of analogs of the coenzyme. *J Biol Chem* **252**, 963-970.

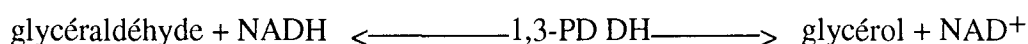
Vasconcelos, I., Girbal, L. & Soucaille, P. (1994). Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixture of glucose and glycerol. *J Bacteriol* **176**, 1443-1450.

Wimpenny, J.W.T. & 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.

V.3. Conclusion.

L'effet d'un co-substrat tel qu'un aldéhyde nous a permis de conforter notre hypothèse sur le fait que la glycérol déshydratase est l'étape limitante de cette fermentation puisque à un fort flux carboné, la présence dans le milieu de culture de glycérol, substrat de la glycérol déshydratase, une forte activité de la 1,3-propanediol déshydrogénase et des concentrations élevées en NADH intracellulaire ne permettent pas la biosynthèse du 1,3-propanediol.

L'ajout dans le milieu de culture de co-substrat, qui peut être utilisé par la 1,3-propanediol déshydrogénase, a permis de débloquent la voie métabolique du glycérol en diminuant la concentration intracellulaire en NADH par la réaction suivante :



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 du 1,3-propanediol et acétate et butyrate.

Dans ces articles, nous avons montré que le rapport NADH / NAD⁺ joue un rôle très important dans le métabolisme du glycérol chez *C. butyricum*. Nous avons montré qu'un rapport NADH/NAD élevé inhibe l'activité de la GAPDH. Un rapport égal à 4,4, observé lors de la culture de *C. butyricum* à un fort taux de dilution, permettait 90 % d'inhibition de l'activité de la GAPDH. La diminution de ce rapport à 2,4, obtenu lorsque nous avons ajouté 1,5 mM de glycéraldéhyde dans le milieu de culture, permettait de récupérer l'activité de la 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 ce qui permet l'augmentation de la biomasse.

Donc le métabolisme du glycérol par *C. butyricum* possède deux modes de régulation :

- * Le premier est 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, un produit très toxique pour elle.
- * Le deuxième est le blocage de la voie de production des acides au niveau de la GAPDH afin d'éviter l'accumulation de très forte concentration de NADH intracellulaire.

*CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES*

Chapitre 4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le principal objectif de ce travail était d'acquérir une meilleure connaissance de la physiologie de *Clostridium butyricum*, en particulier au niveau de la flexibilité de son métabolisme sur glucose et sur glycérol.

La fermentation du glucose par les Clostridia donne comme produits majeurs l'acétate, le butyrate, l'hydrogène moléculaire et le dioxyde de carbone (Van Andel et coll., 1985).

Ces auteurs ont étudié la fermentation du glucose par *C. butyricum* en chemostat et ils ont montré que les proportions relatives des produits de cette fermentation évoluent avec la variation du pH, du taux de dilution et de la concentration du glucose utilisée dans le milieu de culture. Ils ont montré qu'il y a un parallélisme entre le rapport $Q_{\text{acétate}} / Q_{\text{butyrate}}$ et l'augmentation du taux de dilution.

Michel-Savin et coll. (1990) ont étudié la même fermentation mais chez *C. tyrobutyricum* et ont montré qu'en augmentant le taux de dilution ou la concentration du glucose dans le milieu de culture le rapport acétate / butyrate augmente.

Dabrock et coll. (1992) ont étudié l'effet de quelques paramètres sur la fermentation du glucose par *C. pasteurianum* en culture continue, ils ont montré que cette bactérie réagit de la même façon que *C. butyricum* et *C. tyrobutyricum* à savoir un changement dans le rapport acétate / butyrate lorsque le taux de dilution ou le flux augmente.

Il a été démontré chez *C. butyricum* que le mélange de gaz produits lors de la fermentation du glucose par cette souche est constitué approximativement de 60 % de H₂ et 40 % de CO₂. Environ 1,75 moles de H₂ sont produites par mole de glucose consommée et la production de H₂ augmente proportionnellement avec le taux de dilution (Heyndrickx et coll. 1986).

Récemment, il a été montré que lorsque *C. acetobutylicum* se développe sur un mélange glucose/glycérol, le rapport H₂/CO₂ diminue avec l'augmentation de la concentration du glycérol dans le milieu de culture, donc l'ajout d'un substrat plus réduit que le glucose dans le milieu permet la chute du rapport H₂/CO₂ (Vasconcelos et coll., 1994; Saint-Amans et coll., 1994). D'autres équipes de recherche ont réussi à faire pousser *C. butyricum* sur le glycérol et à

produire du 1,3-propanediol sans dégagement d'hydrogène moléculaire (Heyndrickx et coll., 1991; Biebl et coll., 1992; Günzel et coll., 1991).

Tous ces chercheurs avaient constaté que lors de cultures de *C. butyricum* sur glycérol en changeant différentes conditions de culture, ils obtiennent toujours des variations du rapport acétate/butyrate et sans proposer d'explications pour ces différences ainsi que pour les variations du rendement $Y_{1,3-PD}$ de 0,55 à 0,64 observées.

Lors de cultures de *C. butyricum* sur glucose, les seules voies d'oxydation du NADH produits sont la voie de production du butyrate et la voie NADH-ferrédoxine réductase-hydrogénase alors que sur glycérol il existe une voie supplémentaire qui permet d'éliminer une grande partie des éléments réduits produits et d'augmenter ainsi le flux métabolique du glycérol, c'est la voie de production du 1,3-propanediol.

Au cours de cette étude nous avons isolé de nouvelles souches de *C. butyricum* capables d'utiliser le glycérol issu d'une unité d'estérification de colza (sans prétraitement préalable). Ces souches sont plus performantes que les souches décrites dans la littérature au niveau de leur résistance aux produits et au substrat et elles présentent un taux de conversion du glycérol en 1,3-propanediol comparable à celui des autres souches.

L'utilisation du glycérol par *C. butyricum* est assurée grâce à la répartition du flux carboné au niveau de deux branchements métaboliques : le premier branchement répartit le flux carboné du glycérol vers le 1,3-PD et le pyruvate, 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, le premier branchement est soumis à une régulation très stricte puisque la valeur de conversion du glycérol en 1,3-PD a toujours une valeur voisine de 0,58.

La régulation de la biosynthèse des enzymes impliquées dans la première branche métabolique doit être constante ce qui est confirmé par une évolution parallèle des activités enzymatiques telles que celles de la glycérol déshydrogénase, de la glycérol déshydratase et de la 1,3-propanediol déshydrogénase dans diverses conditions de croissance alors que les activités spécifiques des acétate et butyrate kinases peuvent varier dans un rapport aussi élevé que celui de 7,5/1. Cette régulation très rigide exercée au niveau du premier branchement assure en toutes circonstances une concentration intracellulaire en NADH élevée .

Afin de modifier la régulation du premier branchement et de pouvoir augmenter le rendement en 1,3-propanediol nous avons cherché à obtenir des mutants butyrate moins ou des mutants hydrogénase moins. Ainsi des mutants résistants à l'alcool allylique ont pu être

obtenus. Ce composé agit au niveau des alcools déshydrogénases et constitue un agent de sélection très efficace puisqu'il produit sous l'action des alcools déshydrogénases un composé toxique : l'acroléine. Cette méthode de sélection est utilisée pour isoler des mutants qui :

- soit possèdent une alcool déshydrogénase ayant une structure modifiée qui lui permettrait de ne pas transformer l'alcool allylique.

- soit ne présentent plus d'activité déshydrogénase.

Dans le cas de *C. butyricum* les modifications observées l'ont été au niveau de la 1,3-PD déshydrogénase avec une évolution des constantes cinétiques qui permettent à l'enzyme de diminuer son affinité vis-à-vis de cet alcool et une augmentation de la production d'hydrogène moléculaire. Donc la diminution de la production du butyrate n'a pas profité à la production du 1,3-propanediol mais à la production d'hydrogène.

Des mutants hydrogénase moins ont également été obtenus, ils ne produisent pas plus de 1,3-PD mais augmentent leurs productions de butyrate ce qui est parfaitement en accord avec ce que nous venons de dire précédemment.

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 oxydo-réductasique. 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 alors que cette voie métabolique ne fonctionne plus lors de cultures sur glycérol mais que seule l'activité ferrédoxine-NAD⁺ réductasique est utilisée. Nous sommes ici en présence d'une régulation originale qui mérite d'être étudiée et dont le but est très certainement d'éviter une réoxydation du NADH par le système NADH-ferrédoxine réductase-hydrogénase ce qui éliminerait de fait la protection de la cellule vis-à-vis du 3-HPA.

Cette étude a permis de montrer que la diminution de perte d'énergie réductrice, sous forme d'hydrogène moléculaire, observée lorsque *C. butyricum* métabolise le glycérol, est associée à la présence de très faibles activités hydrogénase et NADH-ferrédoxine réductase contrairement aux activités ferrédoxine-NAD⁺ réductases dont les niveaux ne sont pas significativement modifiés.

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. Nous avons suivi l'évolution de l'activité thiolase (qui permet la condensation de 2 molécules d'acétyl-CoA) avec le taux de dilution et les résultats obtenus montrent que cette activité reste stable quel que soit le taux de dilution utilisé alors que le flux de production d'acétyl-CoA augmente. Donc l'étape limitante dans la cinétique d'élimination de l'acétyl-CoA se situe au niveau de la première enzyme de biosynthèse du butyrate à savoir la thiolase. Néanmoins la présence de cet acétyl-CoA intracellulaire a moins d'effet que le rapport

NADH/NAD⁺ sur la régulation de l'utilisation du glycérol. Il est intéressant de noter que l'augmentation du flux carboné s'accompagne d'un accroissement du rapport NADH/NAD⁺ mais également d'une augmentation du pool NAD⁺ + NADH; ce qui conduit à des teneurs intracellulaires particulièrement élevées et qui ne pourront être expliquées que par une étude de la biosynthèse du NAD⁺. L'augmentation du pool NAD⁺ + NADH pourrait s'expliquer par une augmentation concomitante 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 indépendantes de la biosynthèse des oxydo-réductases.

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. L'addition de propionaldéhyde ou de glyceraldéhyde à des cultures continues de *C. butyricum* sur glycérol a permis de montrer que ces co-substrats peuvent réagir avec la 1,3-propanediol déshydrogénase et le NADH et ainsi diminuer la concentration intracellulaire en NADH. Ce qui a pour conséquence le déblocage du flux carboné, en effet nous avons montré qu'à un taux de dilution élevé l'augmentation du flux conduirait au blocage de la voie métabolique de fermentation du glycérol puisque la bactérie ne pourrait plus oxyder les éléments réduits synthétisés. Nous avons montré que ce blocage s'effectue au niveau de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase qui est inhibée par un rapport NADH/NAD⁺ élevé.

Le fait que *Clostridium butyricum* DSM 5431, utilise *in vivo* la totalité du glyceraldéhyde ajouté au milieu de culture prouve que la 1,3-propanediol déshydrogénase est présente en excès dans la cellule. Cette conclusion est renforcée si l'on prend en considération la valeur élevée du Km apparent de l'enzyme pour le glyceraldéhyde. L'enzyme 1,3-propanediol déshydrogénase a deux substrats : le NADH et le 3-HPA et contrairement à ce que pensait l'ensemble des scientifiques concernés par le sujet ce n'est pas le NADH qui est l'élément limitant dans la production du 1,3-PD mais le 3-HPA. Dans ce cas, entre les deux enzymes qui conduisent du glycérol au 1,3-PD c'est donc l'activité de la glycérol déshydratase qui est l'étape limitante de cette bioconversion. 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.

Aux vues de ces expériences, nous proposons le schéma métabolique suivant.

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 oxydo-réductase a donc une activité NADH-fd réductase. De plus la production d'hydrogène, via l'hydrogénase, étant la principale voie de réoxydation de la ferrédoxine réduite, 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 de la glycérol déshydrogénase-glycérol déshydratase où 60 % du glycérol est transformé en 1,3-propanediol. Le flux métabolique est ensuite redivisé au niveau de la pyruvate-fd oxydo-réductase. 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⁺ réductase (diminution de l'activité hydrogénase) et devient une autre voie de formation du NADH. De plus, le pool en NADH intracellulaire étant élevé dans cette culture, l'activité des enzymes NAD dépendantes, comme la 1,3-propanediol déshydrogénase, pourrait être favorisée.

D'après ces résultats, nous arrivons aux conclusions suivantes :

(i) la croissance de *Clostridium butyricum* sur différentes sources de carbone a permis de mettre en évidence la flexibilité métabolique de la bactérie et l'orientation des flux de carbone et d'énergie vers la synthèse de produits terminaux les plus réduits comme réponse à des contraintes énergétiques imposées par un degré global de réduction du substrat croissant et conduit à la formation du 1,3-propanediol.

(ii) l'obtention des mutants a permis de conclure que cette flexibilité métabolique se trouve surtout au niveau de la production des acides alors que production du 1,3-propanediol reste stable.

(iii) du point de vue enzymatique, il apparaît qu'il existe une régulation particulière lorsque le flux de carbone et d'électrons est modifié. D'une part, une plus faible activité hydrogénase lorsque le glycérol est métabolisé explique que la formation d'hydrogène moléculaire soit fortement diminuée. D'autre part, la production de 1,3-propanediol est liée à l'induction de la glycérol déshydratase et de la 1,3-propanediol déshydrogénase.

(iv) un pool en acétyl-CoA, suivant le substrat utilisé, pourrait jouer un rôle important dans la distribution du flux de carbone et d'électrons.

(v) une forte pression en NADH permet une régulation au niveau de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et une meilleure prévention contre une accumulation du 3-hydroxypropionaldéhyde.

Cette étude fait apparaître que grâce à l'utilisation d'un substrat de croissance relativement réduit, le maintien de l'équilibre d'oxydoréduction est un élément vital pour la cellule, ce paramètre jouant un rôle prépondérant au niveau de la régulation des voies métaboliques.

Les caractéristiques physiologiques et cinétiques des voies de conversion du glycérol et la transposition de ces données à la conception d'un procédé optimisé montrent les larges potentialités offertes par l'utilisation de micro-organismes à des fins de valorisation du glycérol.

Ces travaux ont permis d'accéder à une bonne connaissance des enzymes responsables de la synthèse du 1,3-propanediol, des acides et les enzymes impliquées dans le flux d'électrons.

La modification du génotype de *C. butyricum* pourrait permettre d'une part la suppression de la voie de formation du butyrate et d'autre part l'amplification de la voie de formation du 1,3-propanediol.

Dans cette optique, les gènes codant pour les protéines suivantes : la phosphotransbutyrylase, la butyrate kinase, la glycérol déshydratase et la 1,3-propanediol déshydrogénase devront être clonés et séquencés. Les gènes codant pour les deux premières étant organisé en un opéron chez *C. acetobutylicum* (Cary et coll., 1988), l'utilisation de ces gènes comme sonde faciliterait le clonage. La déshydratase et la déshydrogénase ont été cloné chez *K. pneumoniae* et *Citrobacter freundii*, donc l'utilisation d'une sonde permettrait d'isoler ces deux gènes chez *C. butyricum*.

La suppression de la voie du butyrate pourrait être réalisée par délétion ou inactivation par insertion des gène de la thiolase. Des plasmides non replicatifs contenant les modifications de ce gène seraient introduit dans *C. butyricum* par electroporation permettant ainsi la construction d'une nouvelle souche butyrate moins capable synthétiser de l'acétate (seule voie de formation d'ATP et du NADH) et du 1,3-propanediol (seule voie régénératrice des coenzymes réduits) présentant ainsi un véritable intérêt industriel.

BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abeles, R.H., A.M. Brownstein, and C.H. Randles. 1960. β -hydropropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-propanediol by *Aerobacter aerogenes*. Biochim. Biophys. Acta. 41, 530-531.

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. Arch. Microbiol. 101, 59-70.

Adams, M.W., Mortenson, L.E. and Chen, J.S. 1981. hydrogenase. Biochim. Biophys. Acta. 594, 105-176.

Adams, M.W. and Mortenson, L.E. 1984a. The purification of hydrogenase II (uptake hydrogenase) from the anaerobic N₂-fixation bacterium *Clostridium pasteurianum*. Biochim. Biophys. Acta. 766, 51-61.

Adams, M.W. and Mortenson, L.E. 1984b. The physical and catabolic properties of hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. A comparison with hydrogenase I. J. Biol. Chem. 259, 7045-7055.

Adams, M.W., Eccleston, E. and Howard, J.B. 1989. Iron-sulfur clusters of hydrogenase I and hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 4932-4936.

Agarwal, G.P. 1993. Glycerol. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 41, 95-128.

Asnis, R.E. and Brodie, A.F. 1953. A glycerol dehydrogenase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 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*. J. Bacteriol. 72, 314-319.

Axelsson, L., T.C., Chung, W.J., Dobrogosz, and S.E., Lindgren. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. Microb. Ecol. Health Dis. 2, 131-136.

B

- Bahl, H., Andersch, W., Braun, K. and Gottschalk, G. 1982. Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14, 17-20.
- Bahl, H. and Gottschalk, G. 1985. Parameters affecting solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. Biotechnol Bioeng 514, 217-223.
- Ballongue, J. , E. Masion, J. Amine, H. Petitdemange, and R. Gay. 1987. Inhibitor effect of products of metabolism on growth of *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26, 568-573.
- Baronofsky, J.J., Schreurs, W.J.A. and Kashket, E.R. 1984. Uncoupling by acetic acid limits growth and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. Appl. Environ. Microbiol. 48, 1134-1139.
- Beijer, L., Nilsson, R.P., Holmberg, C. and Rutberg, L. 1993. The *glpP* and *glpF* genes of the glycerol regulon in *bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 139, 349-359.
- Berndt, H. and Schlegel, H.G. 1975. Kinetics and properties of β -ketothiolase from *Clostridium pasteurianum*. Arch. Microbiol. 103, 21-30.
- 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., Hippe, H., and Deckwer, W.D. 1992. Glycerol conversion to 1,3 propanediol by newly isolated *clostridia*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 592-597.
- Biebl, H. and Pfenning, N. 1981. 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.
- Biondi, A.C., Feliz, M.R. and Disalvo, E.A. 1991. Surface changes induced by osmotic stress and its influence on the permeability in lipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta. 1069, 5-13.
- Blusson, H., Petitdemange, H. and Gay, R. 1981. A new, fast, and sensitive assay for NADH-ferredoxin oxidoreductase detection in *clostridia*. Anal. Biochem. 110, 176-181.
- Böck, A. and Neidhardt, F.C. 1966. Properties of a mutant of *Escherichia coli* with temperature-sensitive fructose-1,6-diphosphate. J. Bacteriol. 92, 470-476.

Boenigk, R., Bowien, S., and Gottschalk, G. 1993. Fermentation of glycerol to 1,3 propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 453-457.

Bovell, C.R., Packer, L. and Helgerson, R. 1963. Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light scattering. Biochim. Biophys. 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. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. eds. 1974. Bergey's Manual of Determinative bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins. 1268 pp. 8th ed.

C

Cary, J.W., Peterson, D.J., Papoutsakis, E.T. and Bennett, G.N. 1988. Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* phosphotransbutyrylase and butyrate kinase genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170, 4613-4618.

Chen, J.S. and Blanchard, D.K. 1978. Isolation and properties of a unidirectional H₂-oxidizing hydrogenase from the strictly anaerobic N₂-fixing bacterium *Clostridium pasteurianum* W5. Biochem. Biophys. Res. Comm. 84, 1144-1150.

Chen, J.S. and Blanchard, D.K. 1984. Purification and properties of the H₂-oxidizing (uptake) hydrogenase of the N₂-fixing anaerobe *Clostridium pasteurianum* W5. Biochem. Biophys. Res. Comm. 122, 9-16.

Chen, J.S. and Mortenson, L.E. 1974. Purification and properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5. Biochim. Biophys. Acta. 371, 283-298.

Chung, T.C., Axelsson, L., Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. 1989. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. Microb Ecol Health Dis 2, 137-144.

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.

Cooper, R.A. 1984. Metabolism of methylglyoxal in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 36, 49-68.

Cozzarelli, N.R., Koch, J.P., Hayashi, S.I. and Lin, E.C.C. 1965. Growth stasis by accumulated L-alpha-glycerophosphate in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 90, 1325-1329.

Cozzarelli, N.R., Freedberg, W.B. and Lin, E.C.C. 1968. Genetic control of L-alpha-glycerophosphate system in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 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. Arch Microbiol 142, 375-382.

Csonka, L.N. 1981. Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. Mol. Gen. Genet. 182, 82-86.

Cueto, P.H. and Méndez, B.S. 1990. Direct selection of *Clostridium acetobutylicum* fermentation mutants by a proton suicide method. Appl. Environ. Microbiol. 56, 578-580.

D

Dabrock, B., Bahl, H. and Gottschalk, G. 1992. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 1233-1239.

Daniel, R., Boenigk, R. and Gottschalk, G. 1995a. Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpressing of the corresponding gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177, 2151-2156.

Daniel, R. and Gottschalk, G. 1992. Growth temperature-dependent activity of glycerol dehydratase in *Escherichia coli* expressing the *Citrobacter freundii dha* regulon. FEMS Microbiol. Lett. 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*. 177, 4392-4401.

De Boer, M., Broekhuizen, C.P. and Postma, P.W. 1986. Regulation of glycerol kinase by enzyme IIIGlc of the phosphoenolpyruvate : carbohydrate phosphotransferase system. J. Bacteriol. 167, 393-395.

Decker, K. 1965. Acetyl-CoA. In methods of enzymatic analysis, pp. 419-424. Edited by H. U. Bergmeyer, 2nd edn. N. Y. and London, Verlag Chemie Academic press.

Decker, K. and Pfitzer, S. 1972. Determination of steady-state concentrations of adenine nucleotides in growing *Clostridium kluveri* cells by biosynthetic labeling. Anal Biochem 50, 529-539.

Deckwer, W.D, Günzel, B., Biebl, H., Müller, R.J. and Carduck, F.J. 1992. Glycerol conversion to 1,3-propanediol , a versatile component for biodegradable plastics. In : biomass

for energy and industry (Hall DO. G. Grassi and H. Scheer. eds) pp 326-331, Elsevier Appl. Sci. London and New York.

Deckwer, W.D. 1995. Microbial conversion of glycerol to 1,3 propanediol. FEMS Microbiol. Rev. 16, 143-149.

Doëlle, H.W. 1975. Bacterial metabolism, 2nd ed. Academic Press, Inc., New York.

Drake, H.L., Shou-ih, H. and Wood, H.G. 1981. Purification of live components from *Clostridium thermoaceticum* which catalyse synthesis of acetate from pyruvate and methyltetrahydrofolate. Properties of phosphotransacetylase. J. biol. Chem. 256, 11137-11144.

Dürre, P., Kuhn, A., and Gottschalk, G. 1986. Treatment with allyl alcohol selects specifically for mutants of *Clostridium acetobutylicum* defective in butanol synthesis. FEMS Microbiol. Lett. 36, 77-81.

E

Eggersdorfer, M., Meyer, J. and Eckes, P. 1992. Use of renewable resources for non-food materials. FEMS Microbiol. Rev. 103 , 355-364.

F

Ferdinand, W. 1964. The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. Biochem. J. 92, 578-585.

Fick, M., Pierrot, P. and Engasser, J.M. 1985. Optimal conditions for long-term stability of acetone-butanol production by continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnol Lett 7, 503-508.

Fond, O., Matta-Ammouri, G., Petitdemange, H. and Engasser, J.M. 1985. The role of acids on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 195-200.

Forage, R.G. and Foster, M.A. 1979. Resolution of the coenzyme B₁₂-dependent dehydratases of *Klebsiella* sp. and *Citrobacter freundii*. Biochim. Biophys. Acta. 569, 249-258

Forage, R.G. and Foster, M.A. 1982. Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B₁₂-dependent glycerol and diol dehydratase. J. Bacteriol. 149, 413-419.

Forage, R.G. and Lin, E.C.C. 1982. dha system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. J. Bacteriol. 151, 591-599.

Forsberg, C.W. 1987. Production of 1,3 propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other species. Appl. Environ. Microbiol. 53, 639-643.

Fowler, P.W., Ball, A.J.S. and Griffiths, D.E. 1972. The control of alcohol dehydrogenase isozyme synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Biochem. 50, 35-43.

Freedberg, W.B. and Lin, E.C.C. 1973. Three kinds of controls affecting the expression of the *glp* regulon in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 115, 816-823.

Fujinaka, J. and Meyer, J. 1993. Cloning and expressing in *Escherichia coli* of the gene encoding the [2Fe-2S] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. Biochem. Biophys. Res. Com. 192, 1115-1122.



Gavard, R., Hautecoeur, B. and Descourtieux, H. 1957. Phosphotransbutyrylase de *Clostridium acetobutylicum*. Comptes rendus de l'académie des sciences, Paris. 244, 2323-2326.

George, H.A. and Chen, J.S. 1983. Acidic conditions are not obligatory for onset of butanol formation by *Clostridium beijerinckii*. Appl. Environ. Microbiol. 46, 321-327.

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 ratio and ATP pool. J Bacteriol 176, 6433-6438.

Girbal, L., Vasconcelos, I., Saint-Amans, S. and Soucaille, P. 1995. How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. FEMS Microbiol Rev 16, 151-162.

Goncedo, C and Serrano, R. 1989. Energy-yielding metabolism. In : "The yeast". Ed. by Rose and Harrison, Academic Press, pp. 205-259.

Gottschalk, G. and Averoff, B. 1990. Process for the microbiological preparation of 1,3-propanediol from glycerol. Brevet européen n° 0 373 230 A1.

Graves, M.C., Mullenbach, G.T. and Rabinowitz, J.C. 1985. Cloning and nucleotide sequence determination of *Clostridium pasteurianum* ferredoxine gene. Proc. Nati.Acad. Sci. USA 82, 1653-1657.

Gray, W.D. and Sova, C. 1956. Relation of molecule size and structure of alcohol inhibition of glucose utilization by yeast. J. Bacteriol. 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 m³. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 289-294.

H

Hartmanis, M.G.N. 1987. Butyrate kinase from *Clostridium acetobutylicum*. J. Biol. Chem. 262, 617-621.

Hartmanis, M.G.N and Gatenbeck, S. 1984. Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Environ. Microbiol. 47, 1277-1283.

Hayashi, S.I. and Lin, E.C.C. 1965a. Product induction by glycerol kinase in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 14, 515-521.

Hayashi, S.I. and Lin, E.C.C. 1965b. Capture of glycerol by cells of *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. 94, 479-487.

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. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 53-62.

Heyndrickx, M. , De Vos, P. and De ley, J. 1991a. Fermentation characteristics of *Clostridium pasteurianum* LMG 3285 grown on glucose and mannitol. J Appl Bacteriol 70, 52-58.

Heyndrickx, M., De Vos, P., Vancanneyt, M. and De ley, J. 1991b. The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212 t2 and 1213 t1 and *Clostridium pasteurianum* LMG 3285. Appl Microbiol Biotechnol 34, 637-642.

Heyndrickx, M., De Vos, P., Thibau, B., Stevens, P. and De ley, J. 1987. Effect of various external factors on the fermentative production of hydrogen gas from glucose by *Clostridium butyricum* strains in batch culture. System. Appl. Microbiol. 9, 163-168.

Heyndrickx, M., De Vos, P., Speybrouck, A. and De ley, J. 1989. Fermentation of mannitol by *Clostridium butyricum* : role of acetate as an external hydrogen acceptor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31, 323-328.

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. System. Appl. Microbiol. 8, 239-244.

Holdeman, L.V. and Moore, W.E.C. 1977. Anaerobe laboratory manual. Virginia Polytechnic Institute. Blacksburg, VA.

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. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 121-126.

Huesmann, M. and Papoutsakis, E.T. 1986. Effect of acetoacetate, butyrate and uncoupling ionophore on growth and product formation of *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnol. Lett. 8, 37-42.

Hugo, H., Schoberth, S., Madan, V.K. and Gottschalk, G. 1972. Coenzyme specificity of dehydrogenases and fermentation of pyruvate by clostridia. Arch. Microbiol. 87, 189-202.

I

Ingram, L.O. and Buttke, T.M. 1984. Effects of alcohols on microorganisms. Adv. Microb. Physiol. 25, 253-300.

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-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli* : further characterization of respiratory control. J. Bacteriol. 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. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31, 179-183.

J

Jain, M.K., Gleeson, J. and Upreti, G.G. 1978. Intrinsic perturbing ability of alkanols in lipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta. 509, 1-8.

BIBLIOGRAPHIE

Jin, R.Z., Forage, R.G. and Lin, E.C.C. 1982. Glycerol kinase as a substitute for dihydroxyacetone in a mutant of *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol. 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*. J. Bacteriol. 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. J. Bacteriol. 164, 479-483.

Johnson, E.A. and Lin, E.C.C. 1987. *Klebsiella pneumoniae* 1,3-propanediol: NAD⁺ oxidoreductase. J. Bacteriol. 169, 2050-2054.

Junelles, A.M., Janati-Idrissi, R., Petitdemange, H. and Gay, R. 1988. Iron effect on acetone-butanol fermentation. Curr. Microbiol. 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*. L. Biol Chem. 246, 960-963.

Jungermann, K., Ruppecht, E., Ohrloff, C., Thauer, R. K. and Decker, K. 1973. Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic clostridia. Biochim Biophys Acta 305, 268-280.

Jungermann, K., Thauer, R. K., Ruppecht, E., Ohrloff, C. and Decker, K. 1969. Ferredoxin mediated hydrogen formation from NADPH in a cell-free system of *Clostridium kluyveri*. FEBS Lett. 3, 144-146.

K

Karlson, P. 1971. Les lipides et leur métabolisme. In "Biochimie" 2nd 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*. Biochim. Biophys. Acta. 444, 338-343.

Kim, B.H., Bellows, P., Datta, R. and Zeikus, J.G. 1984. Control of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* fermentations, utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhance butanol yields. Appl. Environ. Microbiol. 48, 764-770.

Kim, B.H. and Zeikus, J.G. 1985. Importance of hydrogen metabolism in regulation of solventogenesis by *Clostridium acetobutylicum*. Dev. Ind. Microbiol. 26, 549-556.

Kistler, W.S. Hirsch, C.A., Cozzarelli, N.R. and Lin, E.C.C. 1969. Second pyridine nucleotide-independent L-a-glycerophosphate dehydrogenase in *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol. 100, 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.

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.

└

Lamed, R., and Zeikus, J. G. 1980. Ethanol production by thermophilic bacteria , relationship between fermentation product yields and catabolic enzyme activities in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii*. J. Bacteriol. 144, 569-578.

Lampen, L.O. and Peterson, W.H. 1943. Growth factor requirements of clostridia. Arch. Biochem. Soc. 88, 3426-3430.

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. J. Gen. Microbiol. 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. 2nd World Congress of Chemical Engineering, Montreal, 1, 348-352.

Lin, E.C.C. 1976. Glycerol dissimilation and its regulation in Clostridia. Ann. Rev. Microbiol. 30, 535-578.

Lin, E.C.C., Levin, A.P. and Magasanik, B. 1960. The effects of aerobic metabolism on the inducible glycerol dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes*. J. Biol. Chem. 235, 1824-1829.

Lin, E.C.C. and Magasanik, B. 1960. The activation of glycerol dehydrogenase from *aerobacter aerogenes* by monovalent cations. J. Biol. Chem. 235, 1820-1823.

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, 377-403.

Lindgren, V. and Rutberg, L. 1974. Glycerol metabolism in *Bacillus subtilis* : gene-enzyme relationships. J. Bacteriol. 119, 431-442.

Lipmann, F. and Tuttle, L.C. 1945. A specific micro-method for determination of acyl-phosphates. *J. Biol. Chem.* 159, 21-28.

Lorowitz, W. and Clark, D. 1982. *Escherichia coli* mutants with a temperature-sensitive alcohol dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 152, 935-938.

Lovitt, R.W., Chen, G.S. and Zeikus, J.G. 1988. Ethanol production by thermophilic bacteria: biochemical basis for ethanol and hydrogen tolerance in *Clostridium thermohydrosulphuricum*. *J. Bacteriol.* 170, 2809-2815.

Lutsdorf, U. and Megnet, R. 1968. Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Physiological control of ADH-4. *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 933-944.

Lynen, F., Wesseley, L., Wieland, O. and Rueff, L. 1952. Zur β -oxidation von Fettsäuren *Angew Chem* 64, 687.

M

Magasanik, B. Brooke, M.S. and Karibian, D. 1953. Metabolic pathways of glycerol diddimitation. A comparative study of two strains of *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* 66, 611-619.

Marczak, R., Ballongue, J., Petitdemange, H. and Gay, R. 1984. Regulation of the biosynthesis of NADH-rubredoxin oxidoreductase in *Clostridium acetobutylicum*. *Current Microbiol.* 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.

Marczak, R., Petitdemange, H., Alimi, F., Ballongue, J. and Gay, R. 1983. Influence de la phase de croissance et de la composition du milieu sur le taux de biosynthèse de la NADH-rubrédoxine oxydoréductase chez *Clostridium acetobutylicum*. *C.R. Acad.Sci.* 296, 469-474.

Matin, A and Gottschall, J.C. 1976. Influence of dilution rate on NAD(P) and NAD(P)H concentrations and ratios in a *Pseudomonas* sp. grown in continuous culture. *J Gen Microbiol* 94, 333.

Matin, A. 1992. Genetics of bacterial stress response and its applications. *Ann. N. Y. Aca. Sci.* 665, 1-15.

- Matta-el-Ammouri, G. , Janati-Idrissi, R., Rambourg, J. M., Petitdemange, H. and Gay, R. 1986. Acetone butanol fermentation by a *Clostridium acetobutylicum* mutant with high solvent productivity. *Biomass*. 10, 109-119.
- McGregor, W.G., Phillips, J. and Suelter, C.H. 1974. Purification and characterization of a monovalent cation-activated glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.* 249, 3132-3139.
- Megnet, R. 1967. Mutants partially deficient in alcohol dehydrogenase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 194-207.
- Meinecke, B., Bahl, H. and Gottschalk, G. 1987. Purification and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*. *Arch. Microbiol.* 152, 244-250.
- 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*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 450-459.
- Meyer, J. and Gagnon, J. 1991. Primary structure of hydrogenase I from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* 30, 9697-9704.
- Michel-Savin, D., Marchal, R. and Vandecasteele, J.P. 1990. Butyrate production in continuous culture of *Clostridium tyrobutyricum*, effect of end-product inhibition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 127-131.
- Mickelson, M.N. and Werkman, C.H. 1940. Formation of trimethyleneglycol from glycerol by *Aerobacter*. *Enzymologia.* 8, 252-256.
- Mindich, L. 1968. Pathway from oxidative dissimilation of glycerol in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 96, 565-566.
- Mortenson, L.E. 1964. Purification and analysis of ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Acta.* 81, 71-77.
- Mortenson, L.E., Valentine, R.C. and Carnahan, J.E. 1962. An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 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*. *J. Biol. Chem.* 238, 794-800.

BIBLIOGRAPHIE

Mortlock, R.P., Valentine, R.C. and Wolfe, R.S. 1959. Carbon dioxide activation in the pyruvate clastic system of *Clostridium butyricum*. J. Biol. Chem. 234, 1653-1656.

Moullis, J.M. and Meyer, J. 1982. Characterization of the selenium-substituted 2 [4Fe-4Se] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. Biochemistry. 21, 4762-4771.

N

Nakos, G. and Mortenson, L.E. 1971a. Purification and properties of hydrogenase, an iron-sulfur protein, from *Clostridium pasteurianum* W5. Biochim. Biophys. Acta. 227, 576-583.

Nakos, G. and Mortenson, L.E. 1971b. Structural properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5. Biochemistry. 10, 2442-2449.

Nanninga, H.J. and Gottschalk, J.C. 1986. Isolation of sulfate-reducing bacterium growing with methanol. FEMS Microbiol. Ecol. 38, 125-130.

Neijssel, O.M., Hueting, 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. Arch. Microbiol. 104, 83-87.

Nicaud, C. 1980. Nomenclature des produits chimiques. In : "Guide de la chimie internationale". Ed. by Imprimerie Nouvelles, Yvelot, France.

○

Oh, Y.K., Freese, E.B. and Freese, E. 1973. Abnormal septation and inhibition of sporulation by accumulation of L- α -glycerophosphate in *Bacillus subtilis* mutants. J. Bacteriol. 113, 1034-1045.

Olivier, B., Cord-Ruwisch, R., Matchikian, E.C. and Garcia, J.L. 1988. Characterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp. nov. Arch. Microbiol. 149, 447-450.

P

Pawelkiewicz, J. and Zagalak, B. 1965. Enzymic conversion of glycerol into β -hydroxypropionaldehyde in a cell-free extract from *Aerobacter aerogenes*. Acta. Biochim. Pol. 12, 207-218.

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., Bellanger, M., Lambert, D. et Gay, R. 1971a. Activités NAD et NADP ferrédoxine réductasique chez les clostridia du groupe des butyriques. C. R. Acad. Sci. 272, 2840-2843.

Petitdemange, H., Bellanger, M., Lambert, D. et Gay, R. 1971b. Importance de l'activités NAD-ferrédoxine réductasique chez les clostridia du groupe des butyriques. C. R. Acad. Sci. 273, 985-988.

Petitdemange, H., Bellanger, M., Rosenberg, A. J. et Gay, R. 1970. Réduction du NAD liée à la présence de ferrédoxine par les extraits acellulaires de *Clostridium acetobutylicum*. C. R. Acad. Sci. 270, 199-202.

Petitdemange, H., Cherrier, C., Raval, G. and Gay R. 1976. Regulation of the NADH-fd oxidoreductases in clostridia of butyric group. Biochim. Biophys. Acta. 421, 334-347.

Pike, L. and Sojka, G.A. 1975. Glycerol dissimilation in *Rhodopseudomonas sphaeroidec*. J. Bacteriol. 124, 1101-1105.

Poznanskaya, A.A., Tanizawa, K., Soda, K., Toraya, T. and Fukui, S. 1979. Coenzyme B₁₂-dependent dehydratase: purification, subunit heterogeneity, and reversible association. Arch. Biochem. Biophys. 194, 379-386.

Poznanskaya, A.A., Yakusheva, M.I. and Yakovlev, V.A. 1977. Study on the mechanism of action of adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase from *Aerobacter aerogenes*. II. The inactivation kinetic of glycerol dehydratase complexes with adenosylcobalamin and its analogs. Biochim. Biophys. Acta. 484, 236-243.

Q

Qatibi, A.I. and Boris, A. 1988. Glycerol fermentation and sulfate utilization during the anaerobic digestion process : In "Firth international symposium of anaerobic digestion" Ed by Mouduzzi, Bologna. 69-73.

Qatibi, A.I., Boris, A. and Garcia, J.L. 1991. Sulfate reduction and anaerobic glycerol degradation by a mixed microbial culture. Curr. Microbiol. 22, 47-52.

R

Richey, D.P. and Lin, E.C.C. 1972. Importance of facillated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 112, 784-790.

Rogers, P., and Palosaari, R. 1987. *Clostridium acetobutylicum* mutants that produce butyraldehyde and altered quantities of solvents. Appl. Environ. Microbiol. 53, 2761-2766.

Ruch, D., Karibian, D., Karnovsky, M.L. and Magasanik, B. 1957. Pathways of glycerol dissimilation in two strains of *Aerobacter aerogenes* : enzymatic and trace studies. J. Biol. Chem. 226, 891-899.

Ruch, F.E., Lengeler, J. and Lin, E.C.C. 1974. Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol. 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*. J. Bacteriol. 124, 348-352.

Ruch, F.E., Lin, E.C.C., Kowit, J.D., Tang, C.T. and Goldberg, A. L. 1980. In vivo inactivation of glycerol dehydrogenase in *Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol. 124, 348-352.

S

Saheb, S.A. 1972a. Perméation du glycérol et sporulation chez *Bacillus subtilis*. Can. J. Microbiol. 18, 1307-1313.

Saheb, S.A. 1972b. Study of metabolism of glycerol by two mutants of *Bacillus subtilis*. Can. J. Microbiol. 18, 1315-1325.

Sanno, Y., Wilson, T.H. and Lin, E.C.C. 1968. Control of permeation to glycerol in cells of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 344-349.

Schaupp, A. and Ljungdahl, L.G. 1974. Purification and properties of acetate kinase from *Clostridium thermoaceticum*. Arch. Microbiol. 100, 121-129.

Schneider, Z, Larson, E.G., Jacobson, G. Johnson, B.C. and Pawelkiewicz, J. 1970. Purification and properties of glycerol dehydratase. J. Biol. Chem. 245, 3388-3396.

Schneider, Z and Pawelkiewicz, J. 1966. The properties of glycerol dehydratase isolated from *Aerobacter aerogenes* and the properties of the apoenzyme subunits. Acta. Bioch. Pol. 13, 311-328.

Schütz, H. and Radler, F. 1984. Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1,3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. Syst. Appl. Microbiol. 5, 169-178.

Sebald, M. 1992. Mutations. In , Genetics and Molecular Biology of anaerobic Bacteria. M. SEBALD ed., p 64-97. Springer-Verlag, New York.

- Slininger, P.J., Bothast, R.J. and Smiley, K.L. 1983. Production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 62-67.
- Sobolov, M. and Smiley, K.L. 1960. Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* 79, 261-266.
- Solomon, B.O., Zeng, A.P., Biebl, H., Schliker, H., Posten, C. and Deckwer, W.D. 1995. Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. *J. Biotechnol.* 39, 107-117.
- Sprenger, G.A., Hammer, B.A., Johanson, E.A. and Lin, E.C.C. 1989. Anaerobic growth of *Escherichia coli* on glycerol by importing the dha regulon from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 1255-1262.
- Stadtman, E.R. 1952. The purification and properties of phosphotransacetylase. *J. Biol. Chem.* 196, 527-534.
- St Martin, E.J., Freeberg, W.B. and Lin, E.C.C. 1977. kinase replacement by a dehydrogenase for *Escherichia coli* glycerol utilization. *J. Bacteriol.* 131, 1026-1028.
- Streekstra, 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. *Arch. Microbiol.* 147, 268-275.
- Strickland, J.E. and Miller, N.O. 1968. Inhibition of glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by dihydroxyacetone, high ionic strength and monovalent cations. *Biochim. Biophys. Acta.* 159, 221-226.
- T
- Talarico, T.L. and Dobrogosz, W.J. 1990. Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1195-1197.
- Talarico, T.L., Axelsson, L.T., Novotny, J., Fiuzat, M. and Dobrogosz, W.J. 1990. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol : NAD⁺ oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 943-948.
- 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*. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 1063-1074.
- Thauer, R.K., Jungermann, K. and Decker, K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100-180.

Thauer, R.K., Jungermann, K., Rupprecht, E. and Decker, K. 1969. Hydrogen formation from NADH in cell-free extracts of *Clostridium kluveri*. Acetyl-CoA requirement and ferredoxin dependence. FEBS Lett. 4, 108-112.

Thauer, R.K., Rupprecht, E., Ohrloff, C., Jungermann, K. and Decker, K. 1971. Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-ferredoxin reductase system in *Clostridium kluveri*. J. Biol. Chem. 246, 954-959.

Thorner, J.W. and Paulus, H. Catalytic and allosteric properties of glycerol kinase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 248, 3922-3932.

Tong, I.T., Liao, H.H. and Cameron, D.C. 1991. 1,3-propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae dha* regulon. Appl Environ Microbiol 57, 3541-3546.

Toraya, T., Ushio, K., Fukui, S. and Hogenkamp, H.P.C. 1977. Studies on the mechanism of the adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction by the use of analogs of the coenzyme. J Biol Chem 252, 963-970.

Tsay, S.S., Brown, K.K., and Gaudy, E.T. 1971. Transport of glycerol by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 108, 82-88.

Tubbs, P.K. and Garland, P.B. 1969. Assays of coenzyme A and some Acyl derivatives. In methods in 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. J. Biol. Chem. 237, 2474-2477.

U

Uyeda, K. and Rabinowitz, R.S. 1971a. Pyruvate : Ferredoxin oxidoreductase. III. Purification and properties of the enzyme. J. Biol. Chem. 246, 3111-3119.

Uyeda, K. and Rabinowitz, R.S. 1971b. Pyruvate : Ferredoxin oxidoreductase. III. Studies on the reaction mechanism. J. Biol. Chem. 246, 3120-3125.

V

Valentine, R.C. and Wolfe, R.S. 1960. Purification and role of phosphotransbutyrylase. J. Biol. Chem. 235, 1948-1952.

Valentine, R.C., Brill, J.W. and Sagers, R.D. 1963. Ferredoxin linked DPNreduction by pyruvate in extracts of *Clostridium acidi-urici*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 315-319.

Valentine, R.C., Brill, J.W. and Wolfe, R.S. 1962. Role of ferredoxin in pyridine nucleotide reduction. Proc. Acad. Sci. 48, 1856-1860.

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. J. Bacteriol. 176, 1443-1450.

Volesky, B. and Szczesny, T. 1983. Bacterial conversion of pentose sugars to acetone and butanol. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 27, 101-118.

W

Walter, R.P., Morris, J. G. and Kell, D.B. 1987. The roles of osmotic stress and water activity in the inhibition of the growth, glycolysis and glucose phosphotransferase system of *Clostridium pasteurianum*. J. Gen. Microbiol. 133, 259-266.

Waterson, R.M., Castellino, F.J., Hass, G.M. and Hill, R.L. 1972. Purification and characterization of crotonase from *Clostridium acetobutylicum*. J. Biol. Chem. 247, 5266-5271.

Weissenborn, D.L., Wittekindt, N. and Larson, T.J. 1992. Structure and regulation of the glpF regulon encoding glycerol diffusion facillitor and glycerol kinase of *Escherichia coli* K12. J. Biol. Chem. 267, 6122-6131.

Wiame, J.M., Bourgeois, S. and Lambion, R. 1954. L'oxydation du glycérol étudiée à l'aide de variant de *Bacillus subtilis*. Nature. 174, 37-38.

Wiesenborn, D.P., Rudolph, F.B. and Papoutsakis, E.T. 1988. Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the synthesis of acids and solvents. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2717-2722.

Wiesenborn, D.P., Rudolph, F.B. and Papoutsakis, E.T. 1989. Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in acidogenesis. Appl. Environ. Microbiol. 55, 317-322.

Wills, C. and Phelps, J. 1975. A technique for the isolation of yeast alcohol dehydrogenase mutants with altered substrate specificity. Arch. Biochem. Biophys. 167, 627-637.

BIBLIOGRAPHIE

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. *J. Bacteriol.* 111, 24-32.

Winkelman, J.W. , and Clark, D.P. 1984. Proton suicide , general method for direct selection of sugar transport and fermentation defective substrates. *J. Bacteriol.* 160, 687-690.

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. *Macromol. Chem. Phys.* 195, 793-802.

Woods, D.R. 1993. *The clostridia and biotechnology*. Edited by D.R. Woods, Stoneham, MA, Butterworth-Heinemann.

Y

Youngleson, J.S., Jones, D.T. and Woods, D.R. 1989. Homology between hydroxybutyryl and hydroxyacetyl coenzyme A dehydrogenase enzyme from *Clostridium acetobutylicum* fermentation and vertebrate fatty acid β -oxidation pathways. *J. Bacteriol.* 171, 6800-6807.

Z

Zeng, A.P. 1996. Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioprocess Eng.* 14, 169-175.

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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 485-489.

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. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 902-911.

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. Microbiol. Technol.* 15, 770-779.

Zwaig, N., Kistler, W.S. and Lin, E.C.C. 1970. Glycerol kinase : the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 102, 753-759.

Nom : ABBAD ANDALOUSSI

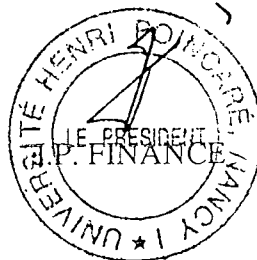
Prénom : Samir

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I
en BIOLOGIE STRUCTURALE, MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le -8 JAN 1997 UHP 135

Le Président de l'Université



RESUME

Le métabolisme anaérobie du glycérol chez *Clostridium butyricum* a fait l'objet d'une étude physiologique approfondie.

Dans un premier temps nous avons isolé de nouvelles souches de *C. butyricum* capables de fermenter du glycérol obtenu à partir d'une unité d'estérification d'huile de colza.

Ensuite à partir de cultures en mode continu, une analyse biochimique complète a permis de définir les voies métaboliques de dissimilation du glycérol : une première voie majoritaire qui conduit à la production du 1,3-propanediol et une seconde voie qui permet la production des acides acétique et butyrique et de l'énergie nécessaire au développement cellulaire. Ces deux voies évoluent parallèlement avec le taux de dilution ce qui donne un rendement en 1,3-propanediol constant quel que soit D et la concentration en glycérol utilisée. Le suivi de l'évolution des nucléotides intracellulaires avec D nous a montré qu'en augmentant ce dernier il y a accumulation du NADH et de l'acétyl-CoA jusqu'à des concentrations critiques à partir desquelles la bactérie ne peut plus oxyder le NADH synthétisé. Aux forts taux de dilution, la présence de glycérol résiduel dans le milieu de culture et de fortes concentrations intracellulaires de NADH nous ont amené à la conclusion que l'activité de la glycérol déshydratase est l'étape limitante de cette fermentation ce qui permet à la bactérie de se protéger contre une accumulation du 3-HPA, produit toxique. Pour confirmer cette étape limitante de la fermentation, nous avons ajouté au milieu de culture deux autres substrats le propionaldéhyde ou le glycéraldéhyde qui peuvent être réduits par la propanediol déshydrogénase. L'utilisation de tels substrats a permis de montrer que l'activité propanediol déshydrogénase n'est pas limitante puisqu'il n'y a pas d'aldéhyde résiduel et que c'est bien la glycérol déshydratase qui limite la production du 1,3-propanediol. Cette étude a également permis de montrer que le rapport NADH/NAD⁺ 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.

Des mutants qui ne dégagent plus d'hydrogène moléculaire ont été obtenus, leur étude a montré que leur 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'H₂.

Ces deux types de mutants montrent que *C. butyricum* possède deux branchements pour la fermentation du glycérol : un premier branchement très rigide qui permet la production du 1,3-propanediol et un second branchement flexible qui permet la production des acides acétique et butyrique.

Mots clés :

Clostridium butyricum, Glycérol, Glucose, 1,3-propanediol, Régulation métabolique, Distribution des flux carbonés, Mutants de résistance, Mutants hydrogénase moins.