



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>



UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DES SCIENCES
U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie – Santé – Environnement

THÈSE

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I

en Biologie Structurale, Moléculaire et Cellulaire

par **Mickaël DESVAUX**

La Fermentation de la Cellulose par *Clostridium cellulolyticum* :
Métabolisme Modèle d'un *Clostridium* Cellulolytique Mésophile.

Soutenue le 2 Novembre 2001 devant la commission d'examen :

Membres du jury:

| | | |
|----------------------|-----------------|--|
| Président : | G. BRANLANT | Professeur d'Université, UHP, Nancy |
| Rapporteurs : | E. FORANO | Chargée de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand |
| | N.D. LINDLEY | Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse |
| Examineurs : | R. MARCHAL | Ingénieur de Recherche, IFP, Paris |
| | H. PETITDEMANGE | Professeur d'Université, UHP, Nancy |

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude à M. le Professeur Henri Petitdemange pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir dirigé cette thèse ainsi que pour la grande autonomie qu'il m'a accordé dans mes recherches.

Mes remerciements s'adressent également à Mme Evelyne Forano, Chargée de Recherche à l'Institut National de Recherche Agronomique, M. Nicholas-David Lindley, Directeur de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique et M. Rémy Marchal, Ingénieur de Recherche à l'Institut Français du Pétrole, qui m'ont fait l'honneur d'être examinateurs et rapporteurs de cette thèse. Je tiens également à remercier sincèrement M. Guy Branlant, Professeur à l'Université Henri Poincaré, pour avoir accepté de présider cette thèse.

Ma gratitude s'adresse aussi à Mme Eliane Petitdemange pour m'avoir fait partager son expérience des bactéries cellulolytiques ainsi que pour son précieux travail de relecture du manuscrit. J'associe également mes remerciements à Guy Raval pour ses conseils pragmatiques et sa précieuse aide technique ainsi qu'à Emmanuel Guedon pour m'avoir mis le pied à l'étrier dès mon arrivée en DEA et pour son assistance continue durant ce travail.

Je remercie M. Alain Kohler pour la réalisation des photographies en microscopie électronique ainsi que le Dr Edward McRae pour ses conseils en anglais lors de la rédaction des publications.

Mes pensées vont tout particulièrement vers Laure Lenôtre pour son soutien et son implication constante tout au long de cette thèse. Je remercie aussi ma famille et mes amis proches pour leur appui.

Enfin, ma reconnaissance s'adresse au personnel du Magasin de Chimie pour leur grande souplesse et efficacité, surtout lors des commandes urgentes de dernière minute. J'associe également à ces remerciements l'ensemble du personnel du Laboratoire de Maturation des ARN et d'Enzymologie Moléculaire pour leur disponibilité et leurs conseils judicieux en biologie moléculaire.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| Abréviations | 1 |
| Préface | 3 |
| Chapitre 1 : Introduction | 6 |
| A. Le substrat carboné : la cellulose | 6 |
| I. La structure de la cellulose | 6 |
| II. La lignocellulose | 9 |
| II.1. Les hémicelluloses | 9 |
| II.2. Les pectines | 11 |
| II.3. La lignine | 11 |
| II.4. La paroi des cellules végétales | 12 |
| B. Les écosystèmes cellulosiques | 14 |
| I. La digestion anaérobie de la cellulose | 14 |
| I.1. La cellulolyse dans le rumen | 17 |
| I.2. La dégradation de la cellulose dans l'environnement | 19 |
| C. La dégradation bactérienne de la cellulose | 20 |
| I. Les bactéries cellulolytiques du genre <i>Clostridium</i> | 23 |
| II. Les cellulases | 27 |
| II.1. Les stratégies d'hydrolyse anaérobie de la cellulose | 30 |
| II.2. Le cellulosome de <i>Clostridium thermocellum</i> | 33 |
| II.3. Le cellulosome chez les autres bactéries | 35 |
| D. La fermentation de la cellulose par les clostridia | 40 |
| I. Les systèmes de transport du substrat carboné | 40 |
| I.1. Le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate | 42 |
| I.2. Les systèmes de transport non-PTS | 44 |
| II. Les voies du catabolisme carboné chez les clostridia | 47 |

| | |
|---|-----------|
| II.1. Le flux électronique | 49 |
| II.2. L'orientation du flux carboné | 52 |
| II.2.1. <i>Clostridium acetobutylicum</i> : modèle de la fermentation acétono-butylique | 53 |
| II.2.2. La fermentation de la cellulose par <i>Clostridium thermocellum</i> | 56 |
| E. La physiologie de <i>Clostridium cellulolyticum</i> | 59 |
| I. Les études en culture discontinue | 59 |
| II. Les études métaboliques en chémostat | 62 |
| F. La culture continue sur cellulose | 67 |
| I. Les réacteurs en continu utilisant des substrats insolubles | 68 |
| II. La culture continue à flux segmenté | 72 |
| G. Le contexte et les objectifs de l'étude | 76 |
| Chapitre 2 : Résultats | 79 |
| A. Le catabolisme du cellobiose par <i>Clostridium cellulolyticum</i> | 79 |
| I. Introduction | 79 |
| II. Résultats | 80 |
| <hr/> | |
| Article 1 : Growth inhibition of <i>Clostridium cellulolyticum</i> by an inefficiently regulated carbon flow. Guedon E., Desvaux M. , Payot S. and Petitdemange H. 1999. <i>Microbiology</i> 145 : 1831-1838. | |
| III. Discussion | 89 |
| B. La fermentation de la cellulose par <i>Clostridium cellulolyticum</i> en culture discontinue | 91 |
| I. Introduction | 91 |
| II. Résultats | 92 |
| <hr/> | |
| Article 2 : Cellulose catabolism by <i>Clostridium cellulolyticum</i> growing in batch culture on defined medium. Desvaux M. , Guedon E. and Petitdemange H. 2000. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> 66 : 2461-2470. | |
| III. Discussion | 103 |
| C. L'influence de l'acidification sur la fermentation de la cellulose par <i>Clostridium cellulolyticum</i> | 105 |
| I. Introduction | 105 |
| II. Résultats | 106 |
| <hr/> | |
| Article 3 : Metabolic flux in cellulose batch and cellulose-fed continuous cultures of <i>Clostridium cellulolyticum</i> in response to acidic environment. Desvaux M. , Guedon E. and Petitdemange H. 2001. <i>Microbiology</i> 147 : 1461-1471. | |
| III. Discussion | 118 |
| D. Etude du catabolisme de la cellulose par <i>Clostridium cellulolyticum</i> en chémostat : influence de la limitation en carbone sur la distribution du flux carboné | 120 |
| I. Introduction | 120 |

| | |
|---|-----|
| II. Résultats | 121 |
| <hr/> | |
| Article 4 : Carbon flux distribution and kinetics of cellulose fermentation in steady-state continuous cultures of <i>Clostridium cellulolyticum</i> on a chemically defined medium. Desvaux M. , Guedon E. and Petitdemange H. 2001. <i>Journal of Bacteriology</i> 183 : 119-130. | |
| <hr/> | |
| III. Discussion | 134 |
| <hr/> | |
| E. Etude du catabolisme de la cellulose par <i>Clostridium cellulolyticum</i> en culture continue : influence de la saturation en substrats sur la distribution des flux | 136 |
| I. Introduction | 136 |
| II. Résultats | 137 |
| <hr/> | |
| Article 5 : Kinetics and metabolism of cellulose degradation at high substrate concentrations in steady-state continuous cultures of <i>Clostridium cellulolyticum</i> on a chemically defined medium. Desvaux M. , Guedon E. and Petitdemange H. 2001. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> 67 : 3837-3845. | |
| <hr/> | |
| III. Discussion | 147 |
| <hr/> | |
| F. Etude du catabolisme de la cellulose par <i>Clostridium cellulolyticum</i> en chémostat : influence de la limitation en azote sur la distribution du flux carboné | 149 |
| I. Introduction | 149 |
| II. Résultats | 150 |
| <hr/> | |
| Article 6 : Flux analysis of the metabolism of <i>Clostridium cellulolyticum</i> grown in cellulose-fed continuous culture on a chemically defined medium under ammonium-limited conditions. Desvaux M. and Petitdemange H. 2001. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> 67 : 3846-3851. | |
| <hr/> | |
| III. Discussion | 157 |
| <hr/> | |
| Chapitre 3 : Conclusion et Perspectives | 159 |
| Bibliographie | 168 |

ABBREVIATIONS

ABREVIATIONS

| | |
|------------------------|---|
| ABC | ATP-binding cassette |
| ADH | alcool déshydrogénase |
| ADP | adénosine diphosphate |
| AK | acétate kinase |
| ATCC | american type culture collection |
| ATP | adénosine triphosphate |
| C | cytosine |
| °C | degré Celcius |
| CBD | cellulose-binding domain |
| CBM | carbohydrate-binding module |
| CMC | carboxyméthylcellulose |
| CoA | coenzyme A |
| <i>D</i> | taux de dilution |
| Da | dalton |
| dD | dockerin domain |
| DTT | dithiothréitol |
| EC | enzyme commission |
| EDTA | acide éthylène diamine tétraacétique |
| eq | équivalent |
| Fd | ferrédoxine |
| FdH₂ | ferrédoxine réduite |
| G | guanine |
| GAPDH | glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase |
| G1P | glucose 1-phosphate |
| G6P | glucose 6-phosphate |
| GHF | glycosyl hydrolase family |
| h | heure |
| K | kilo (10 ³) |
| l | litre |
| LDH | lactate déshydrogénase |
| m | mètre ; milli (10 ⁻³) |
| <i>m</i> | énergie de maintenance |
| M | méga (10 ⁶) ; molarité |
| mol | mole |
| μ | micro (10 ⁻⁶) |
| μ | vitesse spécifique de croissance |
| n | nano (10 ⁻⁹) |
| N | normalité |
| NAD⁺ | nicotinamide adénine dinucléotide oxydé |
| NADH | nicotinamide adénine dinucléotide réduit |

| | |
|---|--|
| NADP⁺ | nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé |
| NADPH | nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit |
| PDC | pyruvate décarboxylase |
| PEP | phosphoénolpyruvate |
| PGM | phosphoglucomutase |
| pH | potentiel d'hydrogène |
| PFO | pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase |
| PTS | phosphotransferase system |
| <i>q</i> | vitesse spécifique de formation ou de consommation |
| SLH | S-layer homology |
| sp. | species |
| UV | ultra-violet |
| <i>Y</i> | rendement |
| <i>Y_{ATP}</i> | rendement énergétique |
| <i>Y_{ATP}^{max}</i> | rendement énergétique maximal |
| <i>Y_{X/S}</i> | rendement de croissance |
| <i>Y_{X/S}^{max}</i> | rendement de croissance maximal |

PREFACE

PREFACE

Selon les plus récentes estimations, la production primaire nette de biomasse serait de 60 milliards de tonnes de carbone par an dans les environnements terrestres et de 53 milliards de tonnes de carbone par an dans les écosystèmes marins (Cox *et al.*, 2000). Environ la moitié de ce carbone serait fixée sous forme de cellulose, ce qui fait de la cellulose le composé organique le plus abondant sur Terre (Béguin et Aubert, 1992). Malgré sa faible densité, la cellulose est le matériau organique naturel le plus résistant et le plus stable connu à ce jour. De par sa nature physico-chimique, la cellulose a tendance à s'accumuler dans l'environnement (Bayer et Lamed, 1992).

D'un point de vue écologique, la compréhension de la décomposition de la matière organique, et de la cellulose en particulier est essentielle pour permettre la modélisation des changements atmosphériques et climatiques (Leschine, 1995) car la dégradation de la cellulose joue un rôle clé dans le cycle du carbone (Béguin et Aubert, 1994). Elle est essentiellement convertie par les micro-organismes en dioxyde de carbone dans des conditions aérobies et en méthane en anaérobiose (Ljungdahl et Eriksson, 1985). Tandis que le rôle et les conséquences du CO₂ sur l'effet de serre ont été très étudiés (Cox *et al.*, 2000 ; Crowley, 2000 ; Delworth et Knutson, 2000 ; Joos *et al.*, 1999), l'importance du méthane dans un tel phénomène commence seulement à être évoqué (Kvenvolden, 1999). Des quantités colossales de ce gaz seraient en fait emprisonnées sous forme d'un composé cristallin, l'hydrate de méthane, qui serait principalement localisé dans les fonds marins. La quantité de carbone liée dans ce clathrate est estimée au double de la quantité présente dans tous les gisements connus de combustibles fossiles. Outre les perspectives énergétiques qu'ouvrent de telles réserves, ce composé aurait largement contribué aux oscillations de la concentration atmosphérique en méthane et donc aux réchauffements climatiques planétaires au cours des âges géologiques (Bains *et al.*, 1999, 2000 ; Hesselbo *et al.*, 2000; Katz *et al.*, 1999 ; Kennet *et al.*, 2000). Quant à son origine, il semble de plus en plus certain qu'elle soit biogène (Bidle *et al.*, 1999 ; Marchesi *et al.*, 2001).

Par ailleurs, cette abondance fait de la cellulose une source de matière première inépuisable, renouvelable et bon marché (Bayer et Lamed, 1992). La valorisation biotechnologique des composés lignocellulosiques notamment par voies microbiologiques apparaît potentiellement prometteuse (Demain, 2000). Parmi les micro-organismes cellulolytiques, les bactéries de la classe *Clostridia* tiennent une place à part. En effet, ces bactéries sont ubiquitaires dans les environnements cellulosiques anaérobies (Leschine, 1995), elles peuvent fermenter la cellulose notamment en éthanol (Mitchell, 1998) et, pour la plupart, elles digèrent la cellulose très efficacement grâce à un système enzymatique particulier, le cellulosome (Schwarz, 2001a). Beaucoup d'études ont été consacrées à l'aspect enzymatique de la dégradation de la cellulose et en particulier du cellulosome (Bayer *et al.*, 1994) tandis que l'aspect microbiologique de cette digestion a été presque entièrement écarté (Mitchell, 1998). Cependant, l'intérêt récurrent de l'utilisation de la cellulose à des fins énergétiques notamment pour la production de biocarburant comme le mélange éthanol-butanol ou le biogaz (Guedon *et al.*, 2000c ; Zaldivar *et al.*, 2001) nécessite de mieux caractériser la physiologie et le métabolisme de ces bactéries.

Dans cette optique, un regain d'intérêt s'est manifesté pour l'étude du catabolisme carboné d'une bactérie cellulolytique mésophile *Clostridium cellulolyticum*. Les premières études de ce métabolisme bactérien ont permis de mettre en évidence certaines régulations du flux du carbone et des électrons, qui se sont révélées différentes entre l'utilisation d'un milieu riche et complexe (Payot, 1999 ; Payot *et al.*, 1998, 1999b) et un milieu de culture de type minéral (Guedon, 2000 ; Guedon *et al.*, 1999a, 1999b, 2000a, 2000b). Cependant, ces études ont jusqu'à présent été réalisées avec une source de carbone soluble, le cellobiose, qui est la cellodextrine majeure supposée être libérée au cours de la cellulolyse (Petitdemange *et al.*, 1984). Cette bactérie étant cellulolytique, il est nécessaire de connaître son métabolisme avec un substrat carboné plus proche de la lignocellulose rencontrée dans son environnement naturel et de voir dans quelle mesure les résultats précédemment obtenus sur cellobiose sont transposables sur cellulose.

Les résultats de ces études menées sur cellulose ont donné lieu à six articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture :

"Growth inhibition of *Clostridium cellulolyticum* by an inefficiently regulated carbon flow."
a été publié dans la revue ***Microbiology***.

"Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium."
a été publié dans la revue ***Applied and Environmental Microbiology***.

"Metabolic flux in cellulose batch and cellulose-fed continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* in response to acidic environment."
a été publié dans la revue ***Microbiology***.

"Carbon flux distribution and kinetics of cellulose fermentation in steady-state continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a chemically defined medium."

a été publié dans la revue ***Journal of Bacteriology***.

"Kinetics and metabolism of cellulose degradation at high substrate concentrations in steady-state continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a chemically defined medium."

a été publié dans la revue ***Applied and Environmental Microbiology***.

"Flux analysis of the metabolism of *Clostridium cellulolyticum* grown in cellulose-fed continuous culture on a chemically defined medium under ammonium-limited conditions."

a été publié dans la revue ***Applied and Environmental Microbiology***.

INTRODUCTION

Chapitre 1 : INTRODUCTION

A. Le substrat carboné : la cellulose

Au siècle dernier, le terme cellulose décrivait la substance constitutive des parois végétales (Iguchi *et al.*, 2000). Par la suite la composition de cette paroi est apparue plus complexe, la cellulose étant associée à d'autres biopolymères (Brown *et al.*, 1996). Bien que la majorité de la cellulose produite dans la nature le soit par les plantes, il est à noter que d'autres organismes peuvent synthétiser notamment des bactéries telles que *Acetobacter xylinum* ou des algues telles que *Valonia macrophysa* (Iguchi *et al.*, 2000 ; Schwarz, 2001). Dans ces derniers cas, la cellulose produite n'est pas associée à d'autres polymères.

I. La structure de la cellulose

La cellulose est un biopolymère insoluble résultant de l'union répétée d'un hydroxyle anomère β d'un D-glucopyrannose avec l'hydroxyle C₄ d'une autre molécule de β -D-glucopyrannose qui par conséquent subit une rotation de 180° par rapport au résidu glucose précédent (Figure 1) (Brown *et al.*, 1996). Le motif structural de base n'est donc pas le glucose comme pour la plupart des glucanes mais un homodisaccharide, le cellobiose (Figure 1). Un groupement aldose libre est porté à une extrémité de chaque chaîne de cellulose. De par ces liaisons glycosidiques β -1,4, cet homopolysaccharide possède une structure complètement linéaire en forme de ruban plat dont le degré de polymérisation varie entre 200 et 25000 unités glucose (Kuga et Brown, 1991 ; Brown *et al.*, 1996). Remarquons que les oligomères de glucose liés en β -1,4 sont communément appelés cellodextrines et qu'ils sont solubles jusqu'à un degré de polymérisation de 7 (Pereira *et al.*, 1988).

Les cycles hémiacétaliques étant en conformation 4C_1 , les groupements hydroxyles des fonctions alcools primaires et secondaires, ainsi que les liaisons glycosidiques sont en position

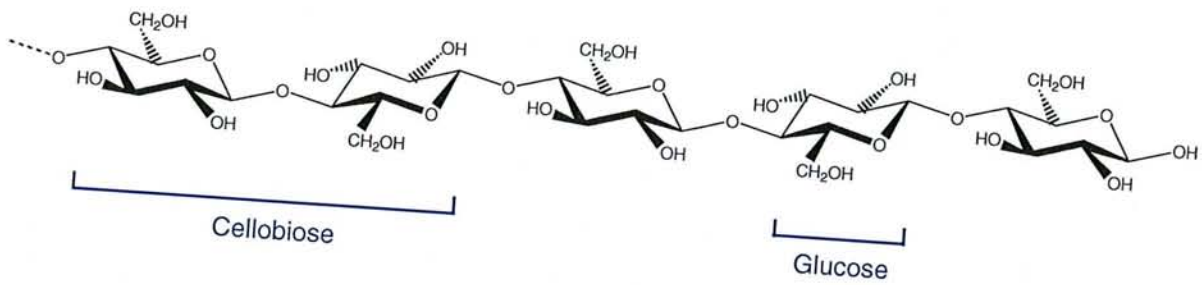


Figure 1 : Schéma de la structure primaire de la cellulose (Adapté de Béguin et Aubert, 1994).

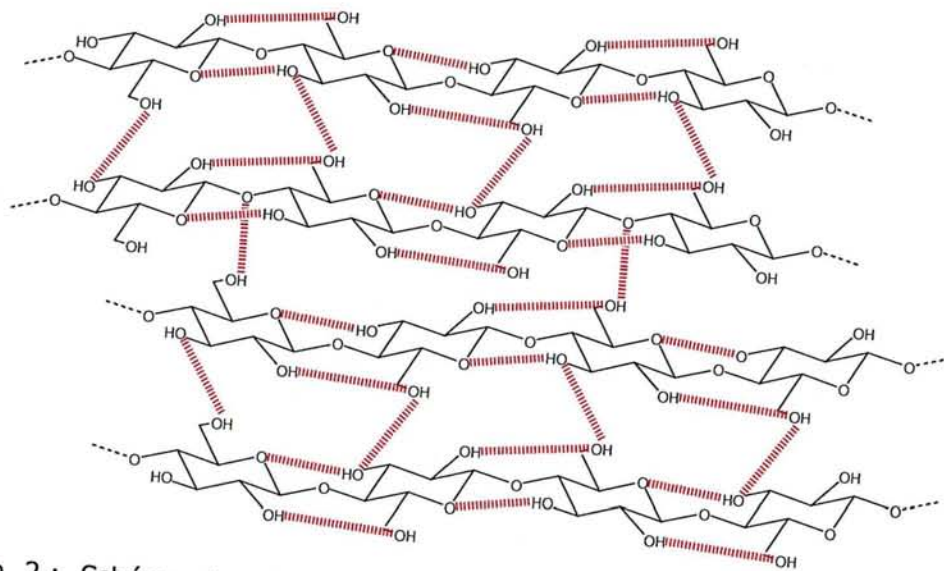


Figure 2 : Schéma des liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires dans la cellulose native (Adapté de Heiner *et al.*, 1995).

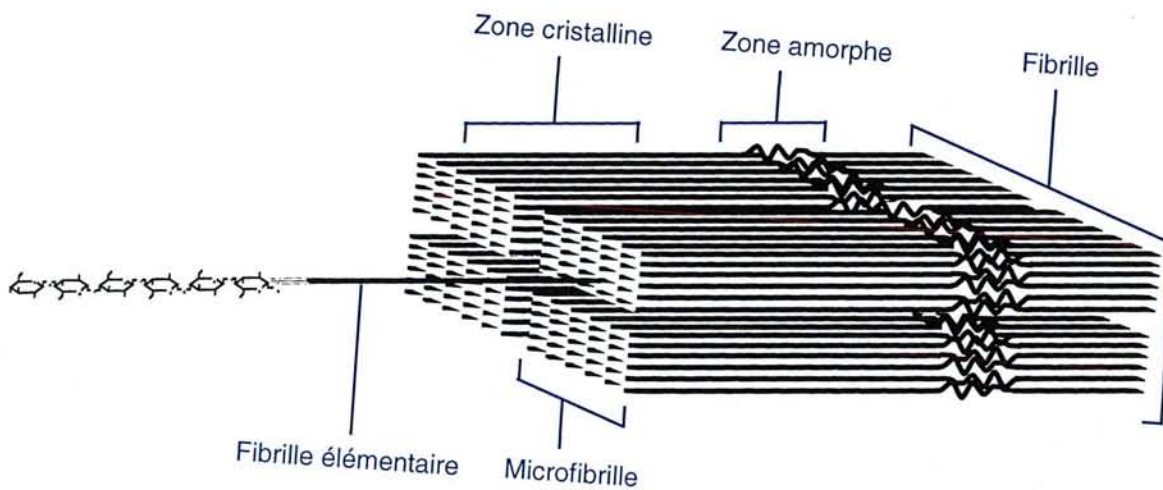


Figure 3 : Schéma de la structure d'une fibrille de cellulose (Adapté de Ljungdahl et Eriksson, 1985).

équatoriale par rapport au plan moyen du cycle. Les chaînes sont rigidifiées par l'établissement de liaisons hydrogènes intramoléculaires ainsi que par des interactions de Van der Waals et des liaisons hydrogènes intermoléculaires (Figure 2) (Cousins et Brown, 1995). Les macromolécules de cellulose ou fibrilles élémentaires, formées par les liaisons hydrogènes intramoléculaires, s'associent pour former une microfibrille contenant 15 à 45 molécules de cellulose. A l'échelle microscopique, ces microfibrilles s'agrègent elles-mêmes en fibrilles de cellulose encore appelées macrofibrilles ou fibres à l'échelle macroscopique (Figure 3) (Ljungdahl et Eriksson, 1985).

La cellulose I est la forme cristalline native de la cellulose naturelle. Elle est métastable et caractérisée par un arrangement parallèle des chaînes de glucane dans l'axe de la microfibrille où toutes les extrémités réductrices pointent dans la même direction (Delmer, 1999). La cellulose II est une autre forme cristalline de cellulose, dite allomorphe, qui est caractérisée par une orientation antiparallèle de chaînes de cellulose (Brown, 1999). Cette forme cristalline est la plus thermodynamiquement stable mais elle n'est produite naturellement que dans de très rares cas notamment par les algues du genre *Halicystis* ou certaines espèces bactériennes du genre *Sarcina* (Sisson, 1941 ; Canale-Parola, 1970 ; Delmer, 1999). La cellulose II est plus généralement obtenue par un procédé de mercerisage où de la cellulose native de type I est lavée après un traitement de quelques heures dans de la soude caustique à 18°C (Ljungdahl et Eriksson, 1985). Les celluloses allomorphes III_I, III_{II}, IV_I et IV_{II} sont les autres formes de cellulose cristalline non native caractérisées jusqu'à présent (Tomme *et al.*, 1995). Comme l'indique le chiffre en indice, elles sont obtenues soit à partir de cellulose I, native et parallèle, soit à partir de cellulose II, non native et antiparallèle, par divers traitements chimiques et physiques (Sarko, 1978 ; Sarko, 2000 ; Tomme *et al.*, 1995 ; Weimer *et al.*, 1991).

Dans la cellulose I native coexistent deux types de cellulose suballomorphe appelées cellulose I_α et I_β (Attala et Vanderhart, 1984). La cellulose I_α est prédominante dans les celluloses produites par les bactéries et elle possède une maille cristalline triclinique (Tomme *et al.*, 1995). La cellulose I_β, plus stable, est caractérisée par une maille cristalline monoclinique et prédomine dans les celluloses natives d'origine végétale (Heiner *et al.*, 1995). En plus de ces formes cristallines, la cellulose native peut se présenter sous une forme amorphe (Ljungdahl et Eriksson, 1985). Ainsi, la cellulose native est dite paracristalline puisque au sein des microfibrilles alternent des régions cristallines hautement ordonnées, composées de cellulose I_α et I_β en proportion variable selon l'origine de la cellulose, et des zones amorphes non structurées (Figure 3) (Bayer et Lamed, 1992 ; Brown *et al.* ; 1996). Le degré de cristallinité est variable selon l'origine de la cellulose, il est généralement compris entre 60 et 90% (Leschine, 1995) ; pour les fibres de coton par exemple il est de 70% mais il atteint près de 100% pour la cellulose produite par l'algue *Valonia macrophysa* (Béguin et Aubert, 1992).

II. La lignocellulose

Le terme lignocellulose désigne la cellulose et les macropolymères qui lui sont naturellement associés dans les tissus végétaux (Barnoud, 1980). La paroi cellulaire des végétaux est constituée principalement de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses, substances pectiques) et de lignine.

II.1. Les hémicelluloses

Ce terme, introduit par Schulze en 1891, désigne l'ensemble des polysaccharides non-pectiques et non-cellulosiques de la paroi des végétaux pouvant être solubilisé par les solutions alcalines (Schulze, 1891). Ce groupe comprend une multitude d'hétéropolysaccharides qui sont le plus souvent branchés. Les principaux monomères retrouvés dans ces hétéroglycanes sont indiqués Figure 4. Les noms des oses constitutifs mineurs sont placés devant le nom du ou des constituants de la chaîne principale et dans un ordre alphabétique.

Ainsi les xylanes, polymères de xyloses liés en β -1,4, les mannanes, polymères de mannoses liés en β -1,4, et les galactanes, polymères de galactoses liés en β -1,3, constituent la majeure partie des chaînes principales trouvées dans les hémicelluloses. Une grande variété de combinaisons de monomères associés à ces chaînes principales peut se former ; parmi les plus communes (Bastawde, 1992) :

- les glucuronoxylanes et glucuronoarabinoxylanes où les unités 4-O-méthyl glucopyranosyluronique sont liées au C₂ du xylose et les unités arabinofuranose par des liaisons α -1,3. Les glucuronoarabinoxylanes prédominent notamment dans l'herbe (Thompson, 1993)
- les glucomannanes et galactoglucomannanes où les galactoses sont branchés par des liaisons α -1,6 au mannose ou au glucose de la chaîne principale eux-mêmes liés en β -1,4.
- les arabinogalactanes où des unités galactose ou arabinose sont liées en β -1,6 sur les galactose de la chaîne principale.

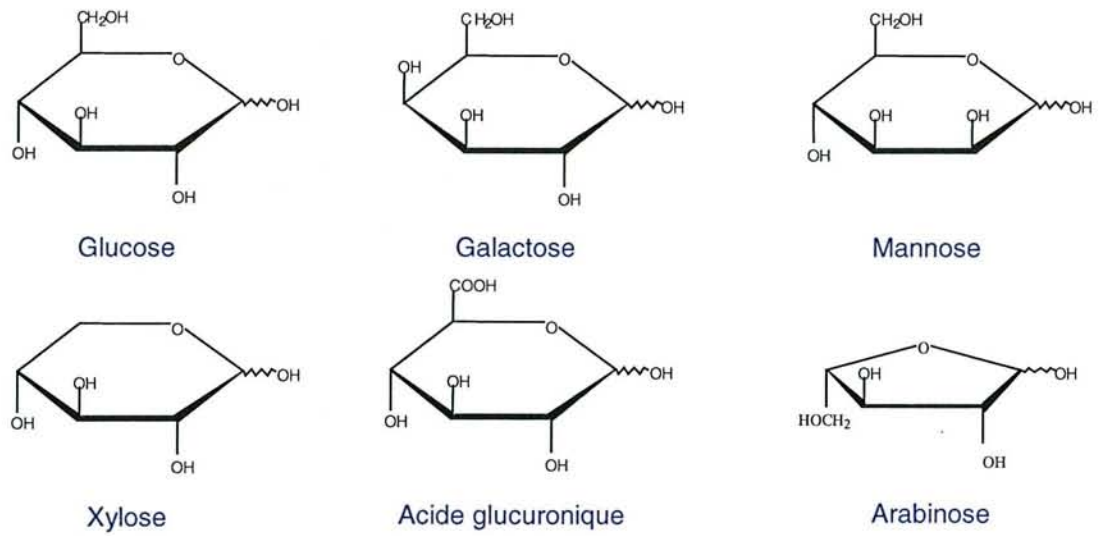


Figure 4 : Monomères constitutifs des hémicelluloses.

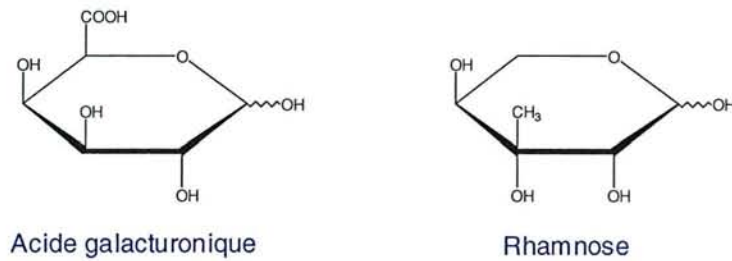


Figure 5 : Monomères constitutifs des substances pectiques.

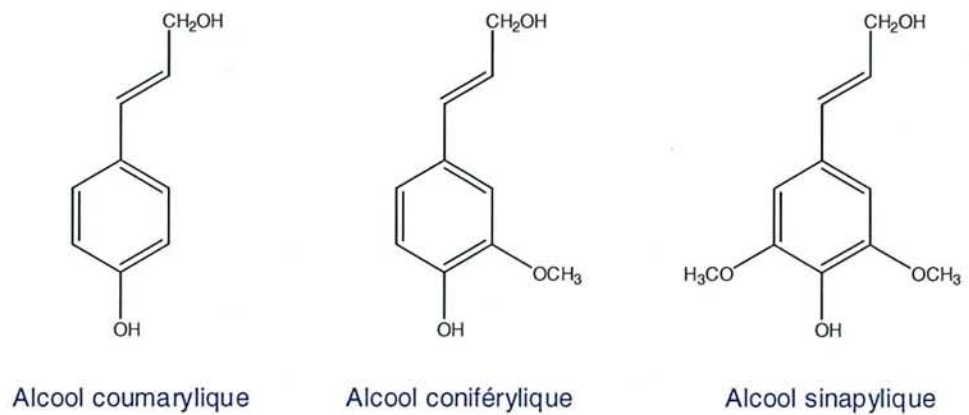


Figure 6 : Monolignols constitutifs des lignines.

II.2. Les pectines

La caractéristique majeure des substances pectiques réside dans leur squelette principal formé d'acides galacturoniques liés en α -1,4 (Thibault, 1980) (Figure 5) présentant trois principaux types d'arrangements structuraux.

L'arrangement le plus simple consiste en une chaîne linéaire d'acides galacturoniques, appelée galacturonane ou homogalacturonane. En général les substances pectiques ont une structure plus complexe résultant de la substitution de certains groupes sur le squelette principal. Ainsi, dans le rhamnogalacturonane s'intercalent des unités de rhamnopyranose liées en α -1,2 avec l'acide galacturonique précédent et en β -1,4 avec le suivant (Figure 5). Il en résulte une déviation, de l'ordre de 90° , de l'axe de la chaîne pectique (Thibault, 1980). Par ailleurs, les unités rhamnose peuvent porter en C₄ ou C₅ des unités galactane ou arabinane pouvant être elles-mêmes ramifiées. La répartition de ces chaînes principales n'est pas homogène le long du squelette principal, ce qui induit l'existence de zones lisses homogalacturoniques juxtaposées à des zones ramifiées. Enfin, dans le xylogalacturonane, des groupements xylopyranosyl sont portés par les acides galacturoniques en C₃.

Ces chaînes polygalacturoniques s'agrègent entre elles par l'intermédiaire de cations divalents qui se fixent entre les groupements carboxyliques. Ces zones de cohésion se structurent en double ou en triple hélice, le plus souvent grâce à des ions calcium ou magnésium.

II.3. La lignine

La lignine est un polymère phénolique ramifié et amorphe (Montiès, 1980). La structure de la lignine est très complexe et apparaît encore à l'heure actuelle aléatoire et désorganisée (Ralph *et al.*, 2001a, 2001b).

Trois monolignols entrent dans sa composition, l'alcool coniférylique, l'alcool coumarylique et l'alcool sinapylique (Figure 6) (Scalbert *et al.*, 1985). Ces trois monomères permettent de former toutes les lignines trouvées dans la nature. Ces monolignols se trouvent en proportions variées selon les espèces et les tissus. Dans l'herbe, par exemple, l'alcool coumarylique est un composant mineur.

La biosynthèse de la lignine résulte de la condensation radicalaire des monolignols. Le processus est initié par la génération d'un radical libre lors de la coupure de la liaison covalente entre l'hydrogène et l'oxygène phénolique. L'électron libre ainsi généré est stabilisé par résonance. Deux monolignols peuvent alors se combiner et former une nouvelle liaison covalente. Un radical libre étant toujours présent au niveau de l'hydroxyle phénolique, ce dimère peut de nouveau se combiner à d'autres mono- ou polylignols. Cette réaction en chaîne permet la constitution d'une structure

polymérique complexe. L'initiation et le contrôle de ce processus restent encore par bien des aspects à élucider (Davin *et al.*, 1997; Ralph *et al.*, 2001b).

II.4. La paroi des cellules végétales

La paroi des cellules végétales est composée de fibres de cellulose entrelacées dans une matrice dense et amorphe de polysaccharides et de lignine. Les parois des cellules jeunes indifférenciées en phase de croissance sont dites de type primaire. Elles contiennent surtout des substances pectiques et des hémicelluloses. En fin de croissance les parois subissent un épaissement suite à la biosynthèse plus abondante de cellulose et à la lignification. Dans cette paroi dite secondaire, la cellulose constitue une charpente fibrillaire rigide et compacte dans laquelle les microfibrilles sont disposées en parallèle (Roland, 1980).

Les tissus lignifiés ne contiennent généralement pas de substances pectiques. Cependant quelques végétaux font exception à cette règle, ainsi dans l'herbe, les pectines sont présentes dans la paroi secondaire. La composition de la paroi en cellulose, hémicelluloses, pectines et lignine est très variable selon l'origine végétale. Par exemple dans l'herbe, la cellulose représente en moyenne 55% des composants de la paroi secondaire contre 30% pour les hémicelluloses, 10% pour la lignine et 5% pour les pectines (Bidlack et Buxton, 1992).

La grande complexité de la structure de la paroi végétale ne permet pas, à l'heure actuelle, de donner une description complète de l'arrangement de ces différentes molécules. Les chaînes de xyloglucanes et de glucuronoarabinoxylanes sont en contact entre elles par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes qui s'établissent à l'interface des microfibrilles de cellulose et de la matrice amorphe. Par ailleurs des liaisons de types ester et éther se forment entre la lignine et les hémicelluloses (Scalbert *et al.*, 1985). Dans cet enchevêtrement de polymères un degré supplémentaire de complexité est introduit par la présence d'autres molécules notamment des glycoprotéines. Dans des circonstances naturelles, la lignocellulose est la forme complexe sous laquelle se présente le plus fréquemment la cellulose aux micro-organismes cellulolytiques (Tomme *et al.*, 1995). Le modèle simplifié de la paroi végétale proposé en Figure 7 pour l'herbe permet d'illustrer les difficultés rencontrées par les micro-organismes lors de l'hydrolyse de la biomasse végétale (Bildlack *et al.*, 1992 ; Carpita et Gibeaut, 1993).

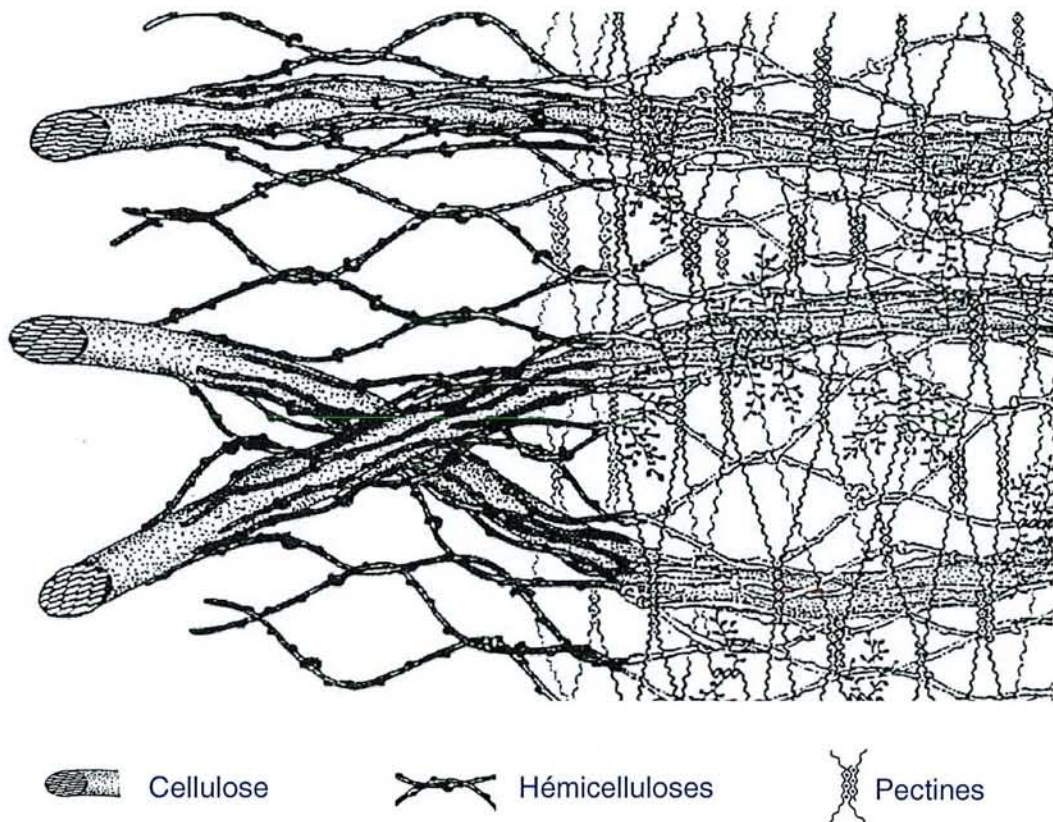


Figure 7 : Modèle de structuration des polysaccharides pariétaux dans l'herbe (Adapté de Carpita et Gibeaut, 1993).

B. Les écosystèmes celluloseux

La digestion des composés celluloseux résulte de l'action de protozoaires, de moisissures et de bactéries (Béguin et Aubert, 1994). Ces micro-organismes cellulolytiques sont présents dans tous les biotopes où la cellulose s'accumule (Bayer et Lamed, 1992). Bien que la majeure partie de la cellulose soit dégradée de manière aérobie, les écosystèmes anaérobies ont un rôle déterminant dans le cycle biogéochimique du carbone (Leschine, 1995). Comme l'indique la Figure 8, ces deux écosystèmes ne sont pas dissociés l'un de l'autre mais bien interconnectés.

Les couches superficielles du sol sont le plus vaste environnement aérobie où la cellulose est oxydée selon la réaction globale suivante : $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ (Ljungdahl et Eriksson, 1985). Des moisissures, telles que *Trichoderma reesei*, et des bactéries, comme celles du genre *Cellulomonas*, participent pour l'essentiel à la dégradation aérobie de la cellulose (Béguin et Aubert, 1992).

Dans les écosystèmes celluloseux, l'interaction symbiotique qui s'établit entre les micro-organismes dégradant le biopolymère insoluble et les micro-organismes satellites de type saccharolytiques, favorise la digestion de la cellulose. En effet, les micro-organismes cellulolytiques produisent des enzymes qui dépolymérisent la cellulose en cellodextrines solubles incorporables par la cellule. Par ailleurs, ces glucides solubles, dont le cellobiose constitue la majeure partie, sont aussi métabolisés par les micro-organismes satellites incapables d'hydrolyser la cellulose. La concentration en cellodextrines solubles, principalement en cellobiose, est ainsi maintenue à un niveau faible ce qui limite l'effet rétro-inhibiteur dû à l'excès d'oligosaccharides sur le système cellulolytique (Bayer *et al.*, 1994 ; Ljungdahl et Eriksson, 1985). Plus généralement, les micro-organismes satellites contribuent à purger le microbiotope des produits dérivés de la dégradation de la lignocellulose en métabolisant les catabolites ou encore les composés aromatiques toxiques issus de la dégradation de la lignine (Bayer *et al.*, 1992). Les micro-organismes satellites peuvent aussi fournir des facteurs de croissance et des agents protecteurs à la microflore lignocelluloseuse. Les interactions de cette association syntrophique sont résumées dans la Figure 8.

I. La digestion anaérobie de la cellulose

La voie de digestion anaérobie de la cellulose peut se résumer à la réaction globale suivante : $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CO_2 + 3CH_4$ (Ljungdahl et Eriksson, 1985). 5 à 10% de la cellulose sont convertis par ce processus.

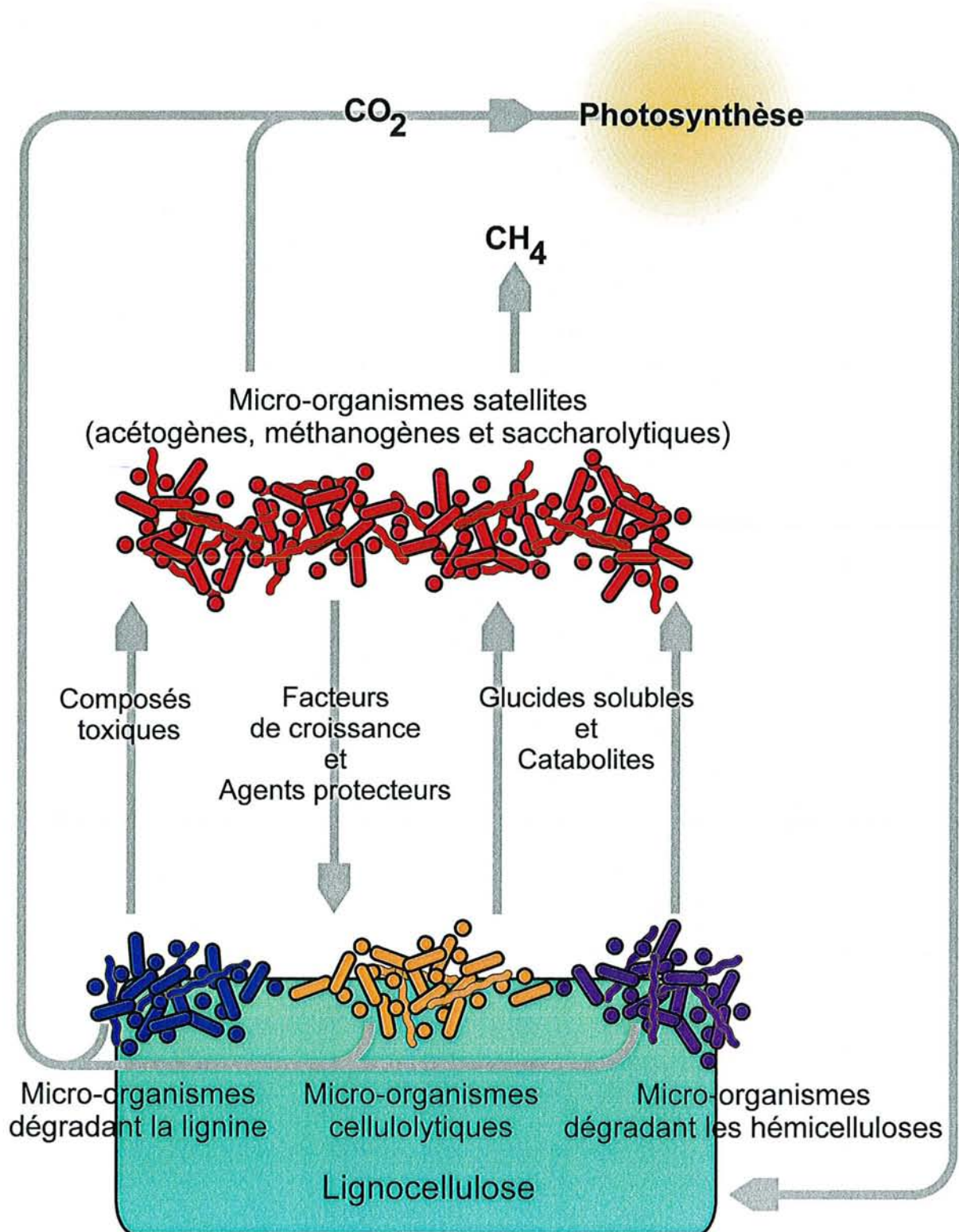


Figure 8 : Description générale et schématique des interactions dans un microbiotope cellulosique (Adapté de Bayer *et al.*, 1994).

Dans tous les écosystèmes cellulotiques des interactions mutualistes s'établissent entre les communautés microbiennes. A la base, les micro-organismes satellites saccharolytiques utilisent les glucides solubles fournis par les micro-organismes cellulolytiques lors de la dégradation de la cellulose. Cependant, dans un environnement anaérobie, en plus du gaz carbonique, la fermentation de ces glucides aboutit à la formation d'autres catabolites principalement des acides organiques, tels que l'acétate, et des solvants organiques, tels que l'éthanol qui pourront être métabolisés par les micro-organismes satellites (Figure 8).

Un autre type d'interaction syntrophique, favorisant la cellulolyse et rencontré exclusivement dans les écosystèmes anaérobies, se situe entre les micro-organismes producteurs et les micro-organismes consommateurs de CO₂ et d'H₂ (Figure 8). Peu d'hydrogène s'échappe de ce type de biotope vers l'atmosphère, car il est immédiatement consommé par les bactéries méthanogènes et acétogènes. Ces bactéries limitent ainsi l'accumulation d'H₂, qui a un effet rétro-inhibiteur (Leschine, 1995). Les acétogènes assimilent le dihydrogène et l'utilisent pour la réduction du gaz carbonique en acétate : $2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$. Les méthanogènes utilisent le dihydrogène pour réduire le gaz carbonique en méthane : $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$. L'acétate, qui est à la fois produit directement par la fermentation de la cellulose et par les micro-organismes satellites, est aussi un précurseur important du méthane dans les environnements anaérobies. En effet, certaines espèces de méthanogènes procèdent à un clivage acétoclastique qui convertit l'acétate en CO₂ et en méthane : $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$ (Jones *et al.*, 1987). Ce transfert d'hydrogène inter-espèces a un rôle central dans les communautés microbiennes anaérobies (Peck et Odom, 1981 ; Morvan *et al.*, 1996).

Le gaz carbonique qui s'échappe dans l'atmosphère est refixé sous forme de matière organique par les organismes autotrophes et notamment sous forme de cellulose principalement par les organismes photosynthétiques (Ljungdahl et Eriksson, 1985). Quant au méthane libéré, il peut-être oxydé en gaz carbonique par certains micro-organismes anaérobies (Boetus *et al.*, 2000 ; Hinrichs *et al.*, 1999) ou se fixer sous forme d'hydrate de méthane principalement dans les fonds marins (Bidle *et al.*, 1999 ; Marchesi *et al.*, 2001).

Le rumen, le tractus intestinal des animaux, le sol, les composts, les marécages, les sédiments marins et d'eau douce sont les biotopes naturels majeurs où prend place la digestion anaérobie de la cellulose (Ljungdahl et Eriksson, 1985). De manière industrielle, la dégradation anaérobie des composés lignocellulosiques est utilisée lors de traitements d'épuration et à des fins énergétiques lors du traitement des déchets ménagers. Le sol, les sédiments et le rumen sont les écosystèmes cellulotiques anaérobies les plus étudiés (Leschine, 1995).

I.1. La cellulolyse dans le rumen

Les ruminants dégradent la lignocellulose dans une section prégastrique et spécialisée du tractus gastro-intestinal, le rumen (Hobson, 1988). Les animaux étant déficients en enzymes dégradant la lignocellulose, et plus particulièrement la cellulose, ce sont des micro-organismes endosymbiotiques qui ont la charge de digérer de tels composés.

Dans le rumen la cellulose n'est pas complètement convertie en gaz carbonique et en méthane comme c'est le cas dans les biotopes anaérobies de l'environnement ; des acides gras volatils tels que l'acétate, le formiate, le propionate ou le butyrate, sont produits en quantités significatives. Ceci s'explique par des temps de séjours beaucoup plus courts que dans le sol et les sédiments, ce qui limite d'autant le taux de conversion en CO₂ et CH₄ (Leschine, 1995).

Les bactéries sont généralement considérées comme responsables de l'activité cellulolytique du rumen mais les moisissures, telles que *Neocallimastix patriciarum*, et les protozoaires, tels que *Eudiplodinium maggii* (Coleman, 1978), apporteraient une contribution non négligeable à ce processus (Leschine, 1995). C'est en s'appuyant sur la prévalence numéraire et la diversité métabolique des espèces que la plus grande partie de l'activité cellulolytique du rumen fut attribuée aux bactéries (Cheng *et al.*, 1991). Dans le rumen, les espèces bactériennes prédominantes pour la dégradation de la cellulose sont *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*.

La participation des protozoaires à la dégradation des composés lignocellulosiques a longtemps été un sujet de controverse (Flint, 1997). En effet, parmi les activités cellulolytiques détectées une éventuelle contamination par des bactéries cellulolytiques endosymbiotiques ne pouvaient totalement être exclue. Bien qu'il existe peu d'exemples, des gènes impliqués dans la dégradation de la lignocellulose ont été récemment isolés chez des protozoaires du rumen, citons une β -1,4 endoglucanase (numéro d'accèsion : AB011273) isolée d'*Epidinium ecaudatum* (Bonhomme, 1988) et une xylanase (numéro d'accèsion : AJ252150) isolée de *Polyplastron multivesiculatum* (Devillard *et al.*, 1999). Certaines études ont estimé que dans le rumen jusqu'à 62% de l'activité cellulolytique associée aux composés végétaux était liée aux protozoaires (Coleman, 1992 ; Newbold *et al.*, 1989 ; Williams et Whithers, 1991), dont la participation active à la digestion de la cellulose se ferait principalement par des activités β -1,4 endoglucanase (Onodera *et al.*, 1988a).

Dans le rumen, un type particulier d'interactions a été constaté entre certaines espèces cellulolytiques de bactéries et de moisissures. Ainsi *Ruminococcus flavefaciens* synthétise une protéine extracellulaire qui inhibe l'activité cellulolytique de *Neocallimastix frontalis* (Bernalier *et al.*, 1992, 1993). Un tel phénomène n'a pour le moment pas encore été constaté entre d'autres espèces.

Bien qu'étant l'écosystème cellulósique anaérobie le plus étudié (Wolin et Miller, 1988), la contribution relative des bactéries, protozoaires et moisissures cellulolytiques du rumen lors de la dégradation de la lignocellulose ainsi que les relations étroites qui s'établissent entre ces communautés microbiennes restent encore un sujet de controverse. Une étude récente a montré que les bactéries ne sont actives que dans les premières étapes de la dégradation de la lignocellulose, une incubation prolongée entraînant la lyse cellulaire (Lee *et al.*, 2000). Après une phase de latence, les moisissures prennent le relais. La contribution de la fraction fongique lors de la digestion apparaît alors bien plus élevée que pour les bactéries. Ceci s'expliquerait par la capacité des moisissures à former des filaments qui pénètrent profondément dans les tissus végétaux ce qui fragilise et fragmente le matériel végétal en le rendant plus sensible à la dégradation par les cellulases (Bauchop, 1981). Quant aux protozoaires il apparaît qu'ils ne peuvent en aucun cas dégrader seuls les composés lignocellulosiques.

Tandis qu'entre les bactéries et les moisissures une synergie d'action se met en place lors de la dégradation de la lignocellulose, les protozoaires entrent en compétition avec le substrat entraînant un ralentissement de la vitesse de cellulolyse (Lee *et al.*, 2000). Ces résultats confirment certaines études (Onodera *et al.*, 1988b ; Hobson et Stewart, 1997) mais s'opposent à d'autres auteurs qui ont observé un mutualisme ou du moins un commensalisme entre les protozoaires et les bactéries ou les moisissures (Orpin, 1984 ; Yoder *et al.*, 1966).

Une grande partie des différences observées entre ces études pourrait être en partie imputable aux substrats. Ainsi, dans la dernière étude de Lee *et al.* (2000), il ne s'agissait pas de lignocellulose ou de cellulose pré-traitée comme dans les autres investigations mais d'herbe coupée ce qui représente un substrat très proche de la ration alimentaire d'un ruminant (Lee *et al.*, 2000 ; Weimer *et al.*, 2000). Par contre, comme pour la majeure partie des études réalisées, les cultures ont été effectuées en mode discontinu alors que le rumen se rapproche plus d'un bioréacteur continu ou du moins semi-continu (Kovárová-Kova et Egli, 1998 ; Shi *et al.*, 1997 ; Chen et Weimer, 2001). Les contradictions de ces études font surtout ressortir la grande complexité de cet écosystème ainsi que les difficultés à construire un microbiote représentatif du rumen *in vitro*.

Beaucoup d'autres espèces animales abritent des bactéries cellulolytiques anaérobies dans leurs intestins notamment le termite, le porc et même l'homme (Breznak, 1982 ; Varel *et al.*, 1984 ; Wedekind *et al.*, 1988). Contrairement aux ruminants, les protozoaires et les moisissures ne sont pas présents lors de la cellulolyse. Par contre, comme chez les ruminants, les acides gras volatils issus de la fermentation rejoignent la circulation sanguine de l'hôte pour être incorporés par les tissus. Ces acides gras constituent une part nutritionnelle non négligeable représentant généralement entre 5 et 70% de la ration énergétique journalière selon l'espèce animale (Leschine, 1995).

I.2. La dégradation de la cellulose dans l'environnement

Le sol est un immense réservoir de carbone, les quelques mètres de profondeur qui le constituent contiennent deux fois plus de carbone que l'atmosphère (Leschine, 1995). La dégradation anaérobie de la cellulose a lieu quelques centimètres sous la surface. Dans un premier temps la cellulose est oxydée en gaz carbonique et les protons sont réduits en dihydrogène, puis un second processus oxyde le dihydrogène et réduit le gaz carbonique en méthane. Comme dans la plupart des niches anaérobies de l'environnement, l'interconnexion de ces deux processus permet la conversion totale de la cellulose en gaz carbonique et en méthane (Wolin et Miller, 1987).

Dans l'environnement les bactéries cellulolytiques anaérobies sont essentiellement du genre *Clostridium* (Leschine, 1995 ; Leschine et Canale-Parola, 1983 ; Warshaw *et al.*, 1985). Elles peuvent être mésophiles comme *Clostridium papyrosolvens* ou thermophiles comme *Clostridium thermocellum*.

Dans certains sédiments marins, où le sulfate est présent en quantité importante, la consommation de dihydrogène par les méthanogènes est supplantée par les bactéries sulfato-réductrices. Dans ce type de biotope, le sulfure d'hydrogène devient le produit majeur de la dégradation de la cellulose (Robinson et Tiedje, 1984).

Les niches écologiques de l'environnement où la cellulose est dégradée sont souvent déficientes en azote combiné (Leschine et Canale-Parola, 1983, 1989 ; Leschine *et al.*, 1988). Chez certaines espèces de *Clostridium*, telles que *Clostridium cellobioparum* ou *Clostridium hungatei* (Bogdahn et Kleiner, 1986 ; Monserrate *et al.*, 2001) des activités nitrogénases ont été détectées. L'avantage sélectif acquis par les bactéries cellulolytiques qui peuvent fixer l'azote atmosphérique est certainement déterminant dans ce type de biotope. En fixant des quantités substantielles d'azote atmosphérique et en le redistribuant sous une forme combinée assimilable par les autres communautés microbiennes ces bactéries auraient un rôle majeur dans l'écosystème (Leschine, 1995).

Bien que le schéma général de la dégradation de la cellulose soit bien connu, le détail de toutes les interactions intermédiaires entre les différents acteurs microbiens reste encore à préciser (Conrad, 1999). En effet, cet écosystème n'est pas aussi délimité et cloisonné que celui du rumen ce qui rend son étude plus délicate.

C. La dégradation bactérienne de la cellulose

Les premières caractérisations de bactéries en tant que cellulolytiques doivent être considérées avec précaution. En effet, ce terme a longtemps été utilisé pour désigner des micro-organismes possédant une activité endoglucanase qui est facilement détectable par l'utilisation de dérivés solubles de la cellulose tels que la carboxyméthylcellulose (CMC), alors qu'une enzyme active sur la CMC n'hydrolyse pas nécessairement la cellulose native cristalline. Une cellulolyse efficace de la cellulose native requiert nécessairement un ensemble d'activités enzymatiques de spécificités différentes. Le Tableau 1 donne une liste exhaustive des bactéries véritablement cellulolytiques isolées jusqu'à présent qui dégradent et peuvent croître sur de la cellulose native cristalline comme seule source de carbone (Schwarz, 2001b).

De manière assez surprenante, aucun procaryote appartenant au domaine *Archaea* et possédant une activité cellulolytique n'a jusqu'à présent été isolé (Bergquist *et al.*, 1999). Dans le domaine *Bacteria*, seuls 7 phyla, parmi les 23, possèdent des espèces cellulolytiques (Tableau 1).

Les premières bactéries cellulolytiques isolées ont été des espèces thermophiles comme *Clostridium thermocellum* (Ng *et al.*, 1977) dont le potentiel d'application industrielle réside dans la fermentation de la cellulose en éthanol. La cellulolyse était estimée plus efficace et plus rapide chez les thermophiles que chez les mésophiles mais progressivement les recherches se sont tournées vers les bactéries mésophiles, des études ayant montré que la vitesse de dégradation de la cellulose par ces micro-organismes pouvait être comparable à celles des thermophiles (Leschine et Canale-Parola, 1983).

La plupart des bactéries cellulolytiques thermophiles peuvent en fait être qualifiées d'extrêmes thermophiles puisque leur température optimale de croissance est généralement supérieure ou égale à 65°C. Elle est par exemple de 65°C pour *Clostridium stercorarium* et de 80°C pour *Thermotoga maritima* qui peut même se développer jusqu'à 90°C (Bergquist *et al.*, 1999). Jusqu'à présent, *Acidothermus cellulolyticus* et *Clostridium thermocellum* sont les deux seules bactéries cellulolytiques thermophiles faisant exception à cette règle puisque leur température optimale de croissance reste comprise entre 55 et 60°C (Bergquist *et al.*, 1999). *Thermoactinomyces*, *Caldibacillus cellulosovorans* et *Rhodothermus marinus* sont les seules bactéries aérobies cellulolytiques et thermophiles isolées, ce qui contraste avec les bactéries anaérobies cellulolytiques thermophiles pour lesquelles 17 espèces ont déjà été isolées.

La seule espèce de bactéries cellulolytiques acidophile est *Acidothermus cellulolyticus* (Tableau 1). Cette bactérie aérobie thermophile peut être qualifiée d'extrémophile puisque son pH optimal de croissance est de 5 mais qui peut croître et dégrader la cellulose jusqu'à pH 3 (Bergquist *et al.*, 1999).

Tableau 1 : Liste des bactéries cellulolytiques classées selon leur groupe taxonomique (Garrity *et al.*, 2001 ; Schwarz, 2001b). Les espèces anaérobies sont indiquées en grisé. Pour la température de croissance, m : mésophile et t : thermophile.

| Position phylogénétique | | | Température de croissance | Source | Référence |
|--|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|--|---|
| Famille | Genre | Espèce | | | |
| Domaine Bacteria, Phylum Thermotogae, Classe Thermotogae, Ordre Thermotogales | | | | | |
| <i>Thermotogaceae</i> | <i>Thermotoga</i> | <i>maritima</i> | t | source chaude | Liebl <i>et al.</i> , 1996 |
| | | <i>neapolitana</i> | t | source chaude | Sunna <i>et al.</i> , 1997 |
| | <i>Fervidobacterium</i> | <i>islandicum</i> | t | source chaude | Hubert <i>et al.</i> , 1990 |
| Domaine Bacteria, Phylum Proteobacteria, Classe Betaproteobacteria, Ordre Burkholderiales | | | | | |
| <i>Alcaligenaceae</i> | <i>Achromobacter</i> | <i>piechaudii</i> | m | sol | Lednicka <i>et al.</i> , 2000 |
| Domaine Bacteria, Phylum Proteobacteria, Classe Gamaproteobacteria, Ordre Xanthomonadales | | | | | |
| <i>Xanthomonadaceae</i> | <i>Xanthomonas</i> | sp. | m | eau saumâtre | Mullings et Parish, 1984 |
| Domaine Bacteria, Phylum Proteobacteria, Classe Gamaproteobacteria, Ordre Pseudomonadales | | | | | |
| <i>Pseudomonadaceae</i> | <i>Pseudomonas</i> | sp. | m | plante | Dees <i>et al.</i> , 1995 |
| | | <i>mendocina</i> | m | sol | Lednicka <i>et al.</i> , 2000 |
| | <i>Cellvibrio</i> | <i>gilvus</i> | m | sol | Coughlan et Mayer, 1992 |
| | | <i>mixtus</i> | m | sol | Lednicka <i>et al.</i> , 2000 |
| | | <i>vulgaris</i> | m | sol | Blackall <i>et al.</i> , 1985 |
| Domaine Bacteria, Phylum Proteobacteria, Classe Deltaproteobacteria, Ordre non classé | | | | | |
| non classé | " <i>Myxobacter</i> " | sp. AL-1 | m | sol | Avitia <i>et al.</i> , 2000 |
| Domaine Bacteria, Phylum Firmicutes, Classe Clostridia, Ordre Clostridiales | | | | | |
| <i>Clostridiaceae</i> | <i>Clostridium</i> | <i>aldrichii</i> | m | bois | Yang <i>et al.</i> , 1990 |
| | | <i>celerecrescens</i> | m | fumier | Palop <i>et al.</i> , 1989 |
| | | <i>cellobioparum</i> | m | rumen | Lamed <i>et al.</i> , 1987 |
| | | <i>cellulofermentans</i> | m | fumier | Yanling <i>et al.</i> , 1991 |
| | | <i>cellulolyticum</i> | m | compost | Petitdemange <i>et al.</i> , 1984 |
| | | <i>cellulosi</i> | m | fumier | Yanling <i>et al.</i> , 1991 |
| | | <i>cellulovorans</i> | m | bois | Sleat <i>et al.</i> , 1984 |
| | | <i>chartatabidum</i> | m | rumen | Kelly <i>et al.</i> , 1987 |
| | | <i>herbivorans</i> | m | intestin de porc | Varel <i>et al.</i> , 1984 |
| | | <i>hungatei</i> | m | sol | Monserrate <i>et al.</i> , 2001 |
| | | <i>josui</i> | m | compost | Sukhumavasi <i>et al.</i> , 1988 |
| | | <i>longisporum</i> | m | rumen | Varel, 1989 |
| | | <i>papyrosolvans</i> | m | papier | Pohlschröder <i>et al.</i> , 1995 |
| | | <i>populeti</i> | m | compost | Sleat et Mah, 1985 |
| | | <i>stercorarium</i> | m | compost | Schwarz <i>et al.</i> , 1995 |
| | | <i>termitidis</i> | m | intestin de termite | Hethener <i>et al.</i> , 1992 |
| | | <i>thermocellum</i> | t | sol | McBee, 1950 |
| | | <i>thermocopriae</i> | t | source chaude | Jin et Toda, 1989 |
| | <i>thermolacticum</i> | t | sol | Le Ruyet <i>et al.</i> , 1985 ; Fardeau <i>et al.</i> , 2001 | |
| | <i>thermopapyrolyticum</i> | t | boue | Méndez <i>et al.</i> , 1991 | |
| <i>Acetivibrio</i> | <i>cellulolyticus</i> | m | eaux usées | Patel <i>et al.</i> , 1980 ; Lin <i>et al.</i> , 1994 | |
| " <i>Bacteroides</i> " | <i>cellulosolvans</i> | m | eaux usées | Murray <i>et al.</i> , 1984 ; Lin <i>et al.</i> , 1994 | |
| " <i>Eubacterium</i> " | <i>cellulosolvans</i> | m | rumen | Prins <i>et al.</i> , 1972 ; Collins <i>et al.</i> , 1994 | |
| <i>Lachnospiraceae</i> | <i>Butyrivibrio</i> | <i>fibrisolvans</i> | m | rumen | Berger <i>et al.</i> , 1990 |
| | <i>Ruminococcus</i> | <i>flavefaciens</i> | m | rumen | Hopgood et Walker, 1967 |
| | | <i>albus</i> | m | rumen | Leatherwood, 1965 |
| <i>Syntrophomonadaceae</i> | <i>Caldocellulosiruptor</i> | <i>saccharolyticus</i> | t | source chaude | Rainey <i>et al.</i> , 1994 |
| | | <i>lactoaceticus</i> | t | source chaude | Mladenovska <i>et al.</i> , 1995 |
| | | <i>krisjanssonii</i> | t | source chaude | Bredholt <i>et al.</i> , 1999 |
| | " <i>Anaerocellum</i> " | <i>thermophilum</i> | t | source chaude | Svetlichnyi <i>et al.</i> , 1990 |
| | " <i>Thermoanaerobacter</i> " | <i>cellulolyticus</i> | t | source chaude | Rainey <i>et al.</i> , 1993 ; Bredholt <i>et al.</i> , 1995 |
| Domaine Bacteria, Phylum Firmicutes, Classe Bacilli, Ordre Bacillales | | | | | |
| <i>Thermoactinomycetaceae</i> | <i>Thermoactinomyces</i> | sp. YX | t | source chaude | Hägerdahl <i>et al.</i> , 1979 |
| <i>Bacillaceae</i> | <i>Caldi bacillus</i> | <i>cellulovorans</i> | t | source chaude | Sunna <i>et al.</i> , 2000 |
| | <i>Bacillus</i> | <i>circulans</i> | m | sol | Kim, 1995 |

| Position phylogénétique | | | Température de croissance | Source | Référence |
|--|-----------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Famille | Genre | Espèce | | | |
| Domaine Bacteria, Phylum Actinobacteria, Classe Actinobacteria, Sous-classe Actinobacteridae, Ordre Actinomycetales | | | | | |
| Sous-ordre Micrococcocineae Famille Cellulomonadaceae | Cellulomonas | <i>biazotea</i> | m | sol | Lednicka <i>et al.</i> , 2000 |
| | | <i>bibula</i> | m | sol | Lednicka <i>et al.</i> , 2000 |
| | | <i>cartae</i> | m | sol | Thayer <i>et al.</i> , 1984 |
| | | <i>cellasea</i> | m | sol | Lednicka <i>et al.</i> , 2000 |
| | | <i>cellulans</i> | m | sol | Schumann <i>et al.</i> , 2001 |
| | | <i>fimi</i> | m | sol | Lednicka <i>et al.</i> , 2000 |
| | | <i>flavigena</i> | m | sol | Lednicka <i>et al.</i> , 2000 |
| | | <i>gelida</i> | m | sol | Thayer <i>et al.</i> , 1984 |
| | | <i>iranensis</i> | m | sol | Elbersen <i>et al.</i> , 2000 |
| | | <i>persica</i> | m | sol | Elbersen <i>et al.</i> , 2000 |
| | | <i>uda</i> | m | eaux usées | Thayer <i>et al.</i> , 1984 |
| Sous-ordre Micrococcocineae Famille Microbacteriaceae | <i>Curtobacterium</i> | <i>falcumfaciens</i> | m | sol | Lednicka <i>et al.</i> , 2000 |
| Sous-ordre Micromonosporineae Famille Micromonosporaceae | <i>Micromonospora</i> | <i>melonospora</i> | m | compost | Wilson, 1992 |
| | <i>Actinoplanes</i> | <i>aurantiaca</i> | m | sol | Coughlan et Mayer, 1992 |
| Sous-ordre Streptomycineae Famille streptomycetaceae | <i>Streptomyces</i> | <i>alboguseolus</i> | m | sol | Schwarz, 2001a |
| | | <i>aureofaciens</i> | m | compost | Schwarz, 2001a |
| | | <i>cellulolyticus</i> | m | sol | Li <i>et al.</i> , 1997 |
| | | <i>flavigriseus</i> | m | sol | McKenzie <i>et al.</i> , 1984 |
| | | <i>lividans</i> | m | sol | Schwarz, 2001a |
| | | <i>nitrosporeus</i> | m | sol | Schwarz, 2001a |
| | | <i>olivochromogenes</i> | m | sol | Coughlan et Mayer, 1992 |
| | | <i>reticuli</i> | m | sol | Schrempf et Walter, 1995 |
| | | <i>rochei</i> | m | intestin de termite | Perito <i>et al.</i> , 1994 |
| | | <i>thermovulgaris</i> | m | sol | Coughlan et Mayer, 1992 |
| | | <i>viridosporus</i> | m | sol | Coughlan et Mayer, 1992 |
| Sous-ordre Streptosporangineae Famille Streptosporangiaceae | <i>Microbispora</i> | <i>bispora</i> | t | sol | Wilson, 1992 |
| Sous-ordre Streptosporangineae Famille Nocardiopepsaceae | <i>Thermobifida</i> | <i>curvata</i> | t | sol | Wilson, 1992 |
| | | <i>fusca</i> | t | sol | Wilson, 1992 |
| Sous-ordre Frankineae Famille Acidothermaceae | <i>Acidothermus</i> | <i>cellulolyticus</i> | t | source chaude | Eppard <i>et al.</i> , 1996 |
| Domaine Bacteria, Phylum Spirochaetes, Classe Spirochaetes, Ordre Spirochaetales | | | | | |
| <i>Spirochaetaceae</i> | <i>Spirochaeta</i> | <i>thermophila</i> | t | source chaude | Aksenova <i>et al.</i> , 1992 |
| Domaine Bacteria, Phylum Fibrobacteres, Classe Fibrobacteres, Ordre Fibrobacterales | | | | | |
| <i>Fibrobacteraceae</i> | <i>Fibrobacter</i> | <i>succinogenes</i> | m | rumen | Schellhorn et Forsberg, 1974 |
| Domaine Bacteria, Phylum Bacteroidetes, Classe Flavobacteria, Ordre Flavobacteriales | | | | | |
| <i>Flavobacteriaceae</i> | <i>Flavobacterium</i> | <i>johnsoniae</i> | m | sol | Lednicka <i>et al.</i> , 2000 |
| Domaine Bacteria, Phylum Bacteroidetes, Classe Sphingobacteria, Ordre Sphingobacteriales | | | | | |
| <i>Flexibacteraceae</i> | <i>Cytophaga</i> | <i>aurantiaca</i> | m | sol | Mullings <i>et al.</i> , 1984 |
| | <i>Cytophaga</i> | <i>hutchinsonii</i> | m | sol | Godden et Penninckx, 1984 |
| | <i>Sporocytophaga</i> | <i>myxococcoides</i> | m | sol | Coughlan et Mayer, 1992 |
| <i>Crenotrichaceae</i> | <i>Rhodothermus</i> | <i>marinus</i> | t | source chaude | Hreggvidsson <i>et al.</i> , 1996 |

Environ 80% des bactéries cellulolytiques isolées jusqu'à présent sont Gram positives et sont réparties en seulement deux phyla (Schwarz, 2001a). Certaines appartiennent au phylum des *Actinobacteria* et seulement à l'ordre *Actinomycetales* qui sont des bactéries Gram positives à haut pourcentage en base G+C (Tableau 1). Les autres appartiennent au phylum *Firmicutes* et essentiellement à l'ordre des *Clostridiales* mais aussi quelques-unes à l'ordre des *Bacillales* qui sont des bactéries Gram positives à bas pourcentage en base G+C (Tableau 1).

La majeure partie des bactéries cellulolytiques anaérobies isolées jusqu'à présent sont situées dans la classe *Clostridia* et plus particulièrement dans l'ordre des *Clostridiales* où elles sont réparties dans les familles *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, et *Syntrophomonodaceae* (Tableau 1) à l'exception de :

- *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neopolitana* et *Fervidobacterium islandicum* qui sont de la famille *Thermotogaceae* appartenant à l'ordre *Thermotogales* dans la classe *Thermotogae* du phylum *Thermotogae*.
- *Spirochaeta thermophila* qui est la seule espèce ayant une activité cellulolytique dans le phylum *Spirochaetes*.
- *Fibrobacter succinogenes* qui est elle aussi la seule espèce isolée du phylum *Fibrobacteres* à posséder une activité cellulolytique.

Ces dernières espèces cellulolytiques anaérobies ont cependant une coloration de Gram négative contrairement aux espèces de la classe des *Clostridia* qui sont Gram positives et qui, bien que réparties en différentes familles, forment un groupe taxonomique plus homogène (Schwarz, 2001a).

I. Les bactéries cellulolytiques du genre *Clostridium*

Le genre *Clostridium* regroupe des bactéries anaérobies strictes, formant des endospores, ne réduisant pas les sulfates, à Gram positif et à bas pourcentage en bases G+C, généralement compris entre 22 et 55%. Ce groupe taxonomique est relativement hétérogène puisque beaucoup de bactéries y ont été classées sur les simples critères cités précédemment (Rainey *et al.*, 1993a, 1993b ; Rainey et Stackebrandt, 1993). Ce genre renferme quelques espèces bactériennes remarquables telles que :

- *Clostridium thermocellum* l'une des premières espèces cellulolytiques bactériennes isolée et caractérisée (Viljoen *et al.*, 1926).

- *Clostridium acetobutylicum* qui fut utilisé pour la production d'acétone et de butanol avant que la synthèse de ces solvants par voie pétrochimique devienne plus rentable (Dixon, 1996).
- *Clostridium botulinum* qui synthétise une puissante neurotoxine principalement impliquée lors d'intoxications alimentaires mais aussi utilisée à des fins médicales (Johnson, 1999).
- ou encore *Epulopiscium fishelsoni* qui est un oxymore au monde microbien puisqu'il s'agit, de par ses dimensions 80 μm \times 600 μm , du plus grand organisme procaryote jamais isolé et quasiment visible à l'œil nu (Angert *et al.*, 1993).

L'analyse de l'ARN ribosomique 16S a récemment permis de proposer un nouvel arrangement phylogénétique des bactéries du genre *Clostridium* (Collins *et al.*, 1994) ; les espèces ont ainsi pu être réparties en 19 clusters différents dont une partie est représentée en Figures 9 et 10 où les bactéries cellulolytiques sont indiquées en rouge.

Le cluster I est le plus vaste et renferme *Clostridium butyricum*, l'espèce de référence du genre (Collins *et al.*, 1994). Il contient aussi quelques espèces cellulolytiques : *Clostridium chartatabidum*, *Clostridium longisporum* et *Clostridium cellulovorans* (Figure 10).

Les bactéries cellulolytiques appartiennent essentiellement au cluster III (Figure 9). En effet, les 8 membres qui le constituent ne sont que des cellulolytiques. Il est intéressant de noter que ce cluster contient à la fois des espèces mésophiles et des espèces thermophiles, ce qui souligne que pour les clostridia cellulolytiques, la température optimale de croissance n'est pas un critère taxonomique contrairement à ce qui a été parfois suggéré (Collins *et al.*, 1994).

Les autres clusters qui renferment des espèces cellulolytiques sont (Figure 10):

- le cluster IV avec *Clostridium cellulosi*.
- le cluster V avec *Clostridium thermocopriæ*.
- le cluster X avec *Anaerocellum thermophilum*, *Caldocellulosiruptor saccharolyticus* et *Thermoanaerobacter cellulolyticus*. Dans la nouvelle pré-classification de Bergey ce cluster se rapporte à une autre famille que *Clostridiaceae* puisqu'il appartient aux *Syntrophomonadaceae* (Garrity *et al.*, 2001 ; Schwartz, 2001a) (Tableau 1).
- et le cluster XIV avec *Clostridium celerecrescens*, *Eubacterium cellulosolvans* et *Clostridium populeti*.

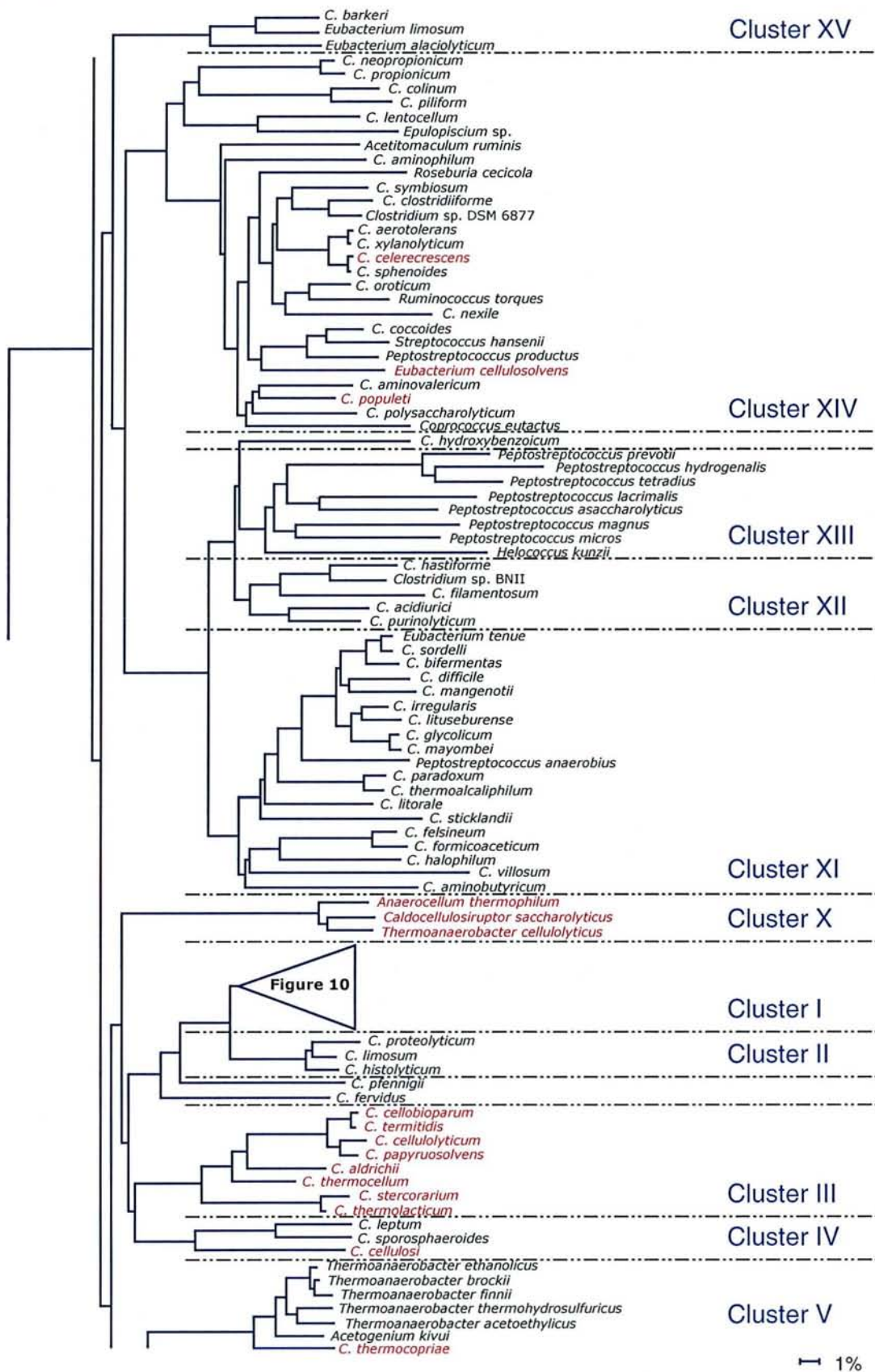


Figure 9 : Dendrogramme représentant les relations phylogénétiques des espèces du genre *Clostridium* à l'extérieur du groupe I (Adapté de Collins *et al.*, 1994). Les espèces cellulolytiques sont indiquées en rouge.

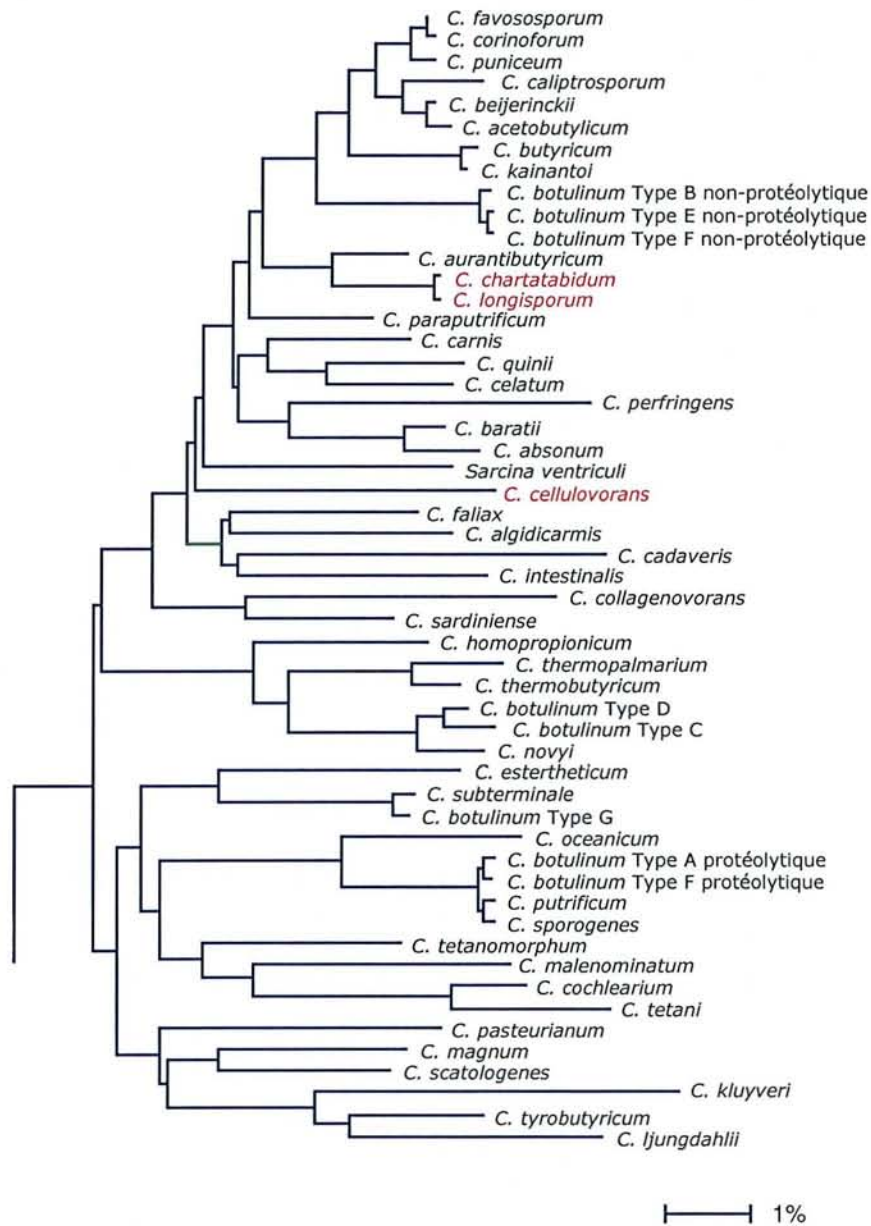


Figure 10 : Dendrogramme représentant les relations phylogénétiques des espèces du genre *Clostridium* à l'intérieur du groupe I (Adapté de Collins *et al.*, 1994). Les espèces cellulolytiques sont indiquées en rouge.

Cette répartition des espèces cellulolytiques met en exergue le fait que la qualification de cellulolytique n'est pas un critère taxonomique pour les bactéries du genre *Clostridium*. Après analyse de leur ARN ribosomique 16S, certaines espèces comme *Acetovibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens* et *Eubacterium cellulosolvens* ont été récemment reclassées comme membres de la famille *Clostridiaceae* (Tableau 1) (Collins *et al.*, 1994 ; Lin *et al.*, 1994).

II. Les cellulases

En se basant sur les recherches intensives menées sur le système cellulasique de la moisissure *Trichoderma reesei*, la cellulolyse fut longtemps considérée comme le résultat de trois types d'activités enzymatiques (Félix et Ljungdahl, 1993) :

- les endoglucanases ou 1,4 β -D-glucane glucanohydrolases (EC 3.2.1.4) qui hydrolysent la liaison osidique de manière aléatoire à l'intérieur de la chaîne de cellulose et qui libèrent des fragments de cellulose plus courts.
- les exoglucanases qui incluent à la fois les glucohydrolases ou 1,4 β -D-glucane glucohydrolases (EC 3.2.1.74) et les cellobiohydrolases ou 1,4 β -D-glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91). Ces enzymes sont processives et libèrent respectivement des unités glucose et des unités cellobiose à partir des extrémités non réductrices des chaînes cellulosiques et des cellodextrines.
- les β -glucosidases ou β -D-glucoside glucohydrolases (EC 3.2.1.21) qui libèrent du glucose à partir des cellodextrines solubles hydrolysées depuis leurs extrémités non-réductrices.

Ces trois types d'hydrolases, de spécificités différentes, permettent une hydrolyse efficace de la cellulose et sont communément désignés sous le terme de cellulases (Tomme *et al.*, 1995). Cependant cette classification des enzymes cellulasiques basée sur des données enzymatiques comme la capacité d'hydrolyse des liaisons β -1,4 glycosidiques selon qu'elles soient à l'intérieur ou à l'extrémité des chaînes de cellulose ou que le substrat soit un polymère ou un oligomère est récemment apparue comme une vue simpliste notamment grâce à de nouvelles données génétiques et cristallographiques (Bayer *et al.*, 1998).

Toutes les cellulases clonées et caractérisées jusqu'à présent ont un mécanisme catalytique similaire : elles hydrolysent la liaison β -1,4 glycosidique selon une catalyse de type acide général qui requiert un donneur de protons et une base nucléophile. Ce mécanisme catalytique fait toujours intervenir dans le site actif deux acides aminés portant des groupements carboxyliques et l'hydrolyse

de la cellulose peut s'accompagner soit de la rétention soit de l'inversion de la configuration du carbone anomérique (Schülein, 2000).

Ces enzymes ont une architecture moléculaire généralement complexe comprenant différentes unités structurales et fonctionnelles (Davies et Henrissat, 1995). Les domaines catalytiques sont généralement liés à des domaines non-catalytiques impliqués dans la liaison au substrat et appelés CBD (cellulose-binding domain) ou plus récemment CBM (carbohydrate-binding module) (Schwarz, 2001a). Ces domaines ont été classés en 26 familles différentes selon la similarité de leur séquence en acides aminés (Coutinho et Henrissat, 1999) et ils possèdent des affinités variables selon le type de structure cristalline de la cellulose. Ces domaines CBD sont joints aux domaines catalytiques par des régions riches en proline, thréonine et sérine ; ces régions agissent comme des bras flexibles et donnent un certain degré de liberté au site actif du domaine catalytique qui peut ainsi atteindre différentes zones autour du domaine CBD fixé au substrat.

Selon la séquence en acides aminés de leur domaine catalytique, ces cellulases ont d'abord été classées en différentes familles de glycosides hydrolases ou GHF (glycoside hydrolase family) (EC 3.2.1.-) (Henrissat et Davies, 1997). Grâce aux données cristallographiques, certaines familles ont pu aussi être regroupées en clans puisque malgré des différences de séquences, les membres de ces familles ont un repliement similaire dans lequel la position des résidus catalytiques est conservée. Jusqu'à présent, parmi les cellulases, 8 familles et 3 clans ont pu être caractérisées selon leur domaine catalytique (Figure 11) (Bayer *et al.*, 1998).

Deux sites peuvent permettre l'adhésion des cellulases à la surface cristalline de la cellulose : le site actif du domaine catalytique ou le domaine CBD lorsque l'enzyme en possède un. Bien que l'activité initiale soit identique à une enzyme possédant un domaine CBD, un domaine catalytique seul s'inactive rapidement (Lee et Brown, 1997 ; Stahlberg *et al.*, 1991). A l'inverse, la présence d'un domaine CBD permet une activité continue le long de la fibre de cellulose même à des emplacements où le domaine catalytique seul aurait une faible efficacité d'hydrolyse (Bolam *et al.*, 1998). Bien que les domaines CBD seuls se lient avec une forte affinité et parfois de manière irréversible à la cellulose, il s'avère qu'en conjonction avec un domaine catalytique, l'activité cellulasique devient processive (Carrard *et al.*, 2000 ; Jervis *et al.*, 1997). Cependant, cette activité processive n'a encore pu être localisée ni au niveau du CBD ni au niveau des domaines catalytiques des cellulases (Irwin *et al.*, 1998).

Une nouvelle nomenclature pour ces enzymes a été proposée récemment afin de permettre une description sans équivoque et une comparaison simple de leurs caractéristiques (Coutinho et Henrissat, 1999 ; Henrissat *et al.*, 1998). En accord avec les pratiques standard de génétique bactérienne les gènes et leurs produits sont désignés par trois lettres tandis que l'organisme dont ils sont issus est désigné par deux lettres. Un chiffre indique à quelle famille l'enzyme se rattache tandis qu'une autre lettre indique l'ordre chronologique de leur publication. Par exemple Ct-Cel5A désigne la

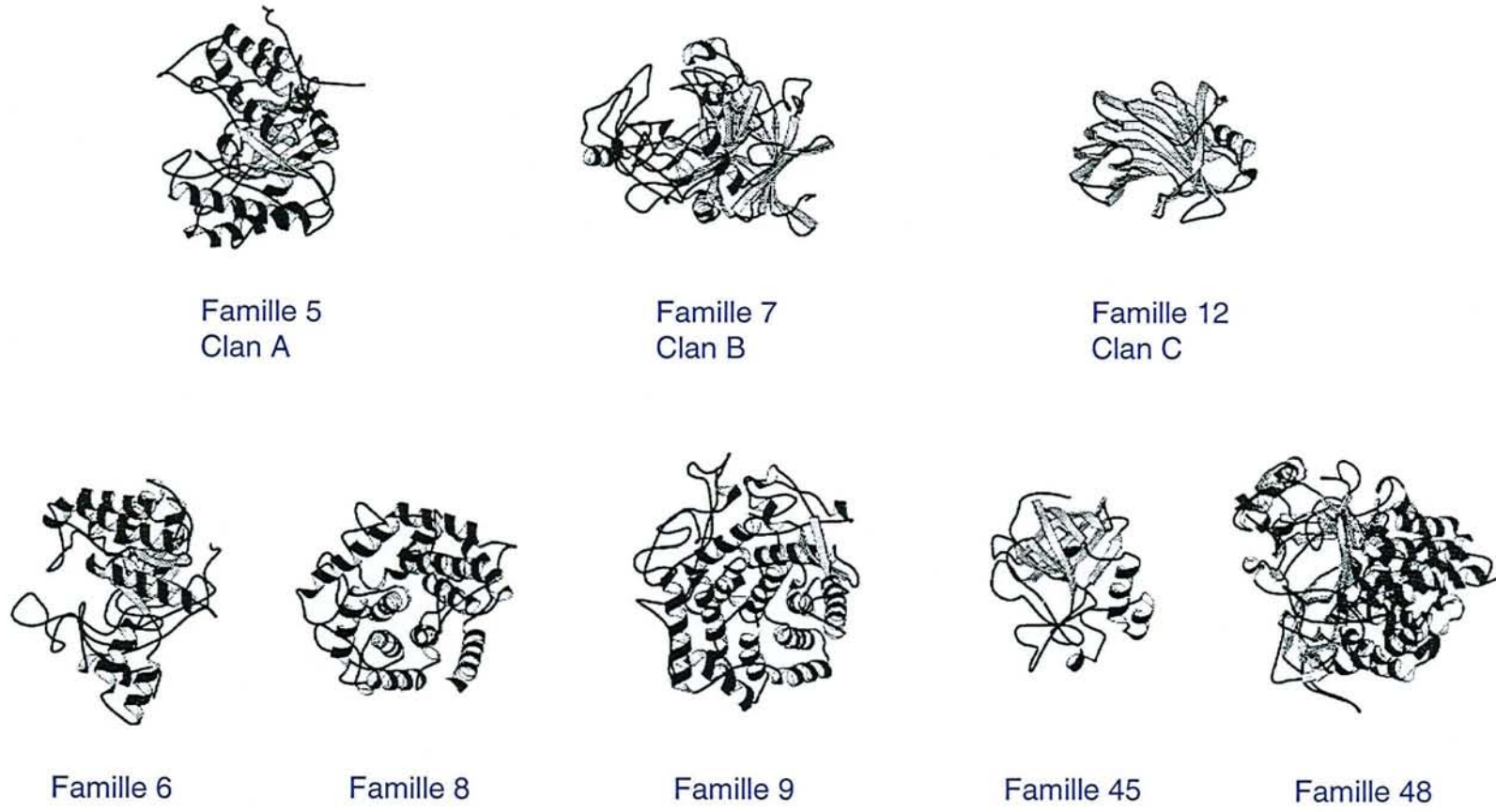


Figure 11 : Représentation des 8 domaines catalytiques de cellulases actuellement caractérisés (Adapté de Bayer *et al.*, 1998).

première (A) cellulase (CelI) isolé chez *Clostridium thermocellum* (Ct) et appartenant à la famille GHF 5 (5). Si une enzyme contient plus d'un domaine catalytique, ceux-ci sont indiqués l'un après l'autre selon leur positionnement dans le sens conventionnel de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale (Henrissat *et al.*, 1998). Ces nouvelles désignations ne font pas la distinction entre les enzymes ayant un mode d'action endo- ou exoglucanolytique. En effet ces deux modes d'actions existent chez toutes les cellulases où souvent un des deux modes prédomine, il ne s'agit donc pas d'une distinction absolue (Henrissat *et al.*, 1998 ; Teeri, 1997 ; Warren, 1996).

II.1. Les stratégies d'hydrolyse anaérobie de la cellulose

Tous les micro-organismes aérobies mais aussi quelques bactéries anaérobies excrètent les cellulases dans le milieu environnant. Ces enzymes sont produites individuellement à des concentrations élevées surtout lorsqu'elles ne possèdent qu'un seul domaine catalytique. Chez *Trichoderma reesei*, un modèle d'action concertée des cellulases a été proposé (Béguin et Aubert, 1992) où les endoglucanases, qui ne sont actives que sur les régions amorphes de la cellulose, libèrent des extrémités non réductrices. Ces extrémités peuvent à leur tour servir de substrats aux cellobiohydrolases. Les glucohydrolases et les cellobiohydrolases poursuivent la dégradation de la cellulose de manière processive jusque dans les zones cristallines qui ne pouvaient être attaquées par les endoglucanases. Les cellodextrines libérées, essentiellement du cellobiose, sont alors hydrolysées par les β -glucosidases qui empêchent ainsi l'accumulation du cellobiose inhibiteur des cellobiohydrolases. Ce modèle met en exergue une synergie d'action des cellulases impliquées (Béguin et Aubert, 1994).

Certaines bactéries anaérobies ont sélectionné une solution plus économique qui ne nécessite pas la synthèse massive de cellulases. Ainsi les bactéries cellulolytiques de la famille des *Syntrophomonadaceae* mais aussi quelques *Clostridiaceae* comme *Clostridium stercorarium* (Tableau 2) combinent plusieurs domaines catalytiques avec un domaine CBD dans un seul et même polypeptide. Un synergisme intramoléculaire, et non plus intermoléculaire, s'établit à la fois au niveau de l'activité et de la processivité des cellulases. Ce système permet la dégradation efficace de la cellulose même à de faibles concentrations en enzymes (Bronnenmeir *et al.*, 1991, 1997).

D'autres micro-organismes cellulolytiques ont sélectionné un système enzymatique encore plus élaboré ; il s'agit d'un complexe multienzymatique extracellulaire situé à la surface des cellules et appelé cellulosome. De tels complexes ont jusqu'à présent été décrits uniquement chez des micro-organismes anaérobies, essentiellement des bactéries de l'ordre *Clostridiales* mais aussi quelques moisissures (Tableau 2) (Bayer *et al.*, 1998).

Tableau 2 : Micro-organismes cellulolytiques possédant un cellulosome (Bayer *et al.*, 1998).

| Organisme | Mise en évidence | Référence |
|-----------------------------------|---|---|
| Bactéries anaérobies | | |
| <i>Clostridium thermocellum</i> | Cellulosome isolé, Preuves immunochimiques | Béguin <i>et al.</i> , 1996 ; Lamed <i>et al.</i> , 1983 ; Gerngross <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Clostridium cellulovorans</i> | Cellulosome isolé | Lamed <i>et al.</i> , 1987 ; Shoseyov <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>Clostridium cellulolyticum</i> | Cellulosome isolé | Bayer <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Clostridium josui</i> | Cellulosome isolé | Bayer <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Clostridium papyrosolvans</i> | Cellulosome isolé | Bayer <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Bacteroides cellulosolvans</i> | Cellulosome isolé, Preuves immunochimiques | Bayer <i>et al.</i> , 1998 ; Lamed <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Acetovibrio cellulolyticus</i> | Identification de complexes de haut poids moléculaire | Bayer <i>et al.</i> , 1998 ; Lamed <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | Identification de complexes de haut poids moléculaire | Kirby <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Ruminococcus albus</i> | Identification de complexes de haut poids moléculaire | Lamed <i>et al.</i> , 1987 ; Ohmiya <i>et al.</i> , 1997 |
| Moisissures anaérobies | | |
| <i>Neocallimastix patriciarum</i> | Identification de complexes de haut poids moléculaire | Fanutti <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Piromyces</i> | Preuves immunochimiques | Fanutti <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Orpinomyces</i> | Identification de complexes de haut poids moléculaire | Li <i>et al.</i> , 1997 |

Les bactéries possédant un cellulosome n'appartiennent pas nécessairement au même cluster ni à la même famille. En effet, un cellulosome peut aussi bien être présent chez des bactéries de la famille des *Lachnospiraceae* comme *Ruminococcus albus* que chez des bactéries de la famille des *Clostridiaceae* comme *Clostridium cellulovorans* et *Clostridium thermocellum*, qui par ailleurs sont dans des clusters différents, respectivement le I et le III (Figure 9, 10) (Tableau 1, 2). De même, qu'une bactérie du genre *Clostridium* soit ou non cellulolytique n'a pas de signification taxonomique, la présence d'un cellulosome n'en a pas davantage (Collins *et al.*, 1994). Par contre, jusqu'à présent, les seules preuves formelles de la présence d'un cellulosome chez les bactéries n'existent que pour l'ordre *Clostridiales*.

Les deux seules autres bactéries suspectées de posséder une structure cellulomale sont *Thermobifida fusca* et *Fibrobacter succinogenes* (Schwarz, 2001a). Cependant ces données issues de clichés en microscopie électronique n'ont pas encore pu être confirmées ni génétiquement ni biochimiquement. Chez une *Archaea*, *Archaeoglobus fulgidus*, des séquences homologues à des domaines cellulomaux ont été détectées mais aucune activité cellulolytique ni aucune séquence d'endo- ou d'exoglucanase n'a pu être mise en évidence (Bayer *et al.*, 1999). Enfin, le séquençage complet du génome de *Clostridium acetobutylicum*, publié très récemment (Nolling *et al.*, 2001), a révélé la présence d'un cluster de gènes cellulomaux complets mais vraisemblablement cryptiques puisque aucune activité cellulolytique n'a jamais été rapportée chez ce micro-organisme, ces gènes ne seraient donc pas exprimés ou du moins pas correctement (Schwarz, 2001a).

Bien que des preuves manquent encore, la plupart des bactéries cellulolytiques du genre *Clostridium* sont fortement suspectées de posséder un cellulosome notamment *Clostridium hungatei* ou *Eubacterium cellulosolvens* (Blair *et al.*, 1999 ; Monserrate *et al.*, 2001). Pour *Clostridium stercorarium* et *Clostridium thermolacticum* cependant, la présence d'un cellulosome est presque exclue puisque ni une approche génétique ni une approche biochimique n'a permis sa mise en évidence (Bronnenmeir *et al.*, 1990, 1991, 1997 ; Fardeau *et al.*, 2001).

Le cellulosome, qui est une alternative à l'excrétion des cellulases, présente de nombreux avantages. D'abord, vis à vis de la cellule (Shoham *et al.*, 1999) :

- l'adhésion directement et spécifiquement sur la cellulose est un avantage décisif dans la compétition pour le substrat qui peut s'établir entre les différentes communautés microbiennes de l'écosystème.
- la proximité du cellulosome permet le maintien d'une concentration appropriée en substrats solubles et assure un métabolisme cellulaire efficace en évitant la diffusion des glucides solubles dans le milieu extracellulaire.

Ensuite d'un point de vue enzymatique (Schwarz, 2001a) :

- Le cellulosome permet d'optimiser au maximum le synergisme de plusieurs cellulases et assure un rapport correct entre les différentes activités cellulases en les adaptant aux types de substrats à hydrolyser.
- Le cellulosome évite les adsorptions non productives grâce à un espacement optimal entre les composants catalytiques.
- La compétitivité d'adsorption due à un nombre de sites limités est évitée par une interaction forte d'un seul complexe multienzymatique sur un seul site grâce à un domaine d'adhésion de faible spécificité (Norsker *et al.*, 1999).
- La présence de plusieurs activités enzymatiques de spécificités diverses évite les pauses lors de l'hydrolyse.

II.2. Le cellulosome de *Clostridium thermocellum*

Le cellulosome le plus complexe mais aussi le plus étudié est celui de *Clostridium thermocellum*. C'est chez cette bactérie que le concept de cellulosome fut introduit pour la première fois (Lamed *et al.*, 1983). Parmi les bactéries possédant un cellulosome, *Clostridium thermocellum* est la plus thermophile. La composition de ce complexe varie entre les différentes souches de *Clostridium thermocellum* avec une taille comprise entre 2,0 et 6,5 MDa (Béguin et Lemaire, 1996).

Les cellulosomes se trouvent à la surface de la cellule sous forme de protubérances polycellulosomales regroupant de une à plusieurs dizaines de cellulosomes dont la masse moléculaire peut atteindre 100 MDa (Figure 12). Ces protubérances permettent l'adhésion des bactéries à la cellulose (Bayer et Lamed, 1986 ; Mayer *et al.*, 1987 ; Lamed et Bayer, 1988a, 1988b) (Figure 13). Quelques cellulosomes peuvent aussi être présents à l'état libre dans le milieu de culture (Bayer *et al.*, 1983).

Les cellulases associées au cellulosome possèdent un domaine particulier appelé domaine d'arrimage ou dDI (dockerin domain) (Gerngross *et al.*, 1993) qui interagit spécifiquement avec un domaine de cohésion ou cDI (Cohesin domain) (Fujino *et al.*, 1992, 1993). Les domaines cDI sont présents dans une protéine dite d'échafaudage dépourvue d'activité catalytique et appelée CipA (Bayer *et al.*, 1998), celle-ci est constituée de neuf domaines cDI, d'un domaine CBD, d'un domaine hydrophile appelé domaine X et d'un domaine d'arrimage modifié localisé en C-terminal et appelé dDII (Leibovitz et Béguin, 1996). La Figure 14 présente le modèle actuellement retenu de structuration du cellulosome de *Clostridium thermocellum*. La spécificité d'interaction est relativement faible entre les

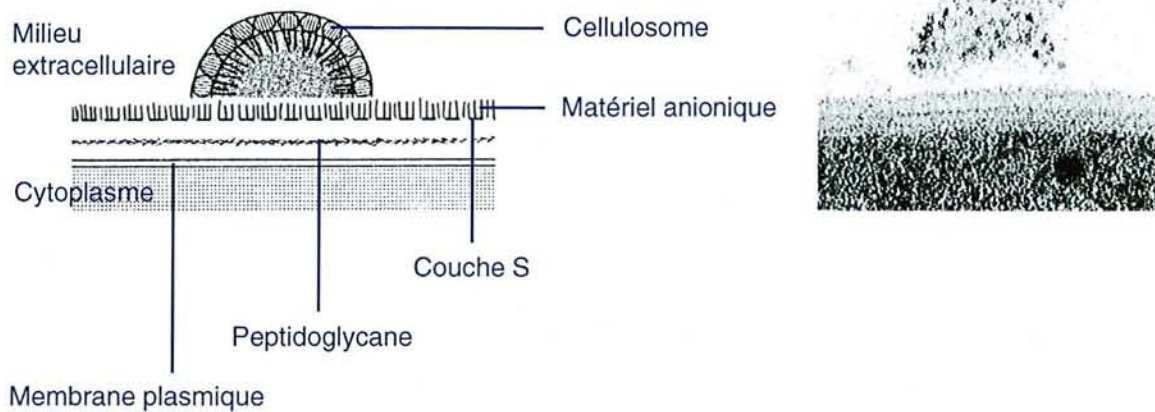


Figure 12 : Schéma d'une protubérance polycellulosomale de *Clostridium thermocellum* d'après une électronographie obtenue en microscopie électronique par transmission (Adapté de Shoham *et al.*, 1999).

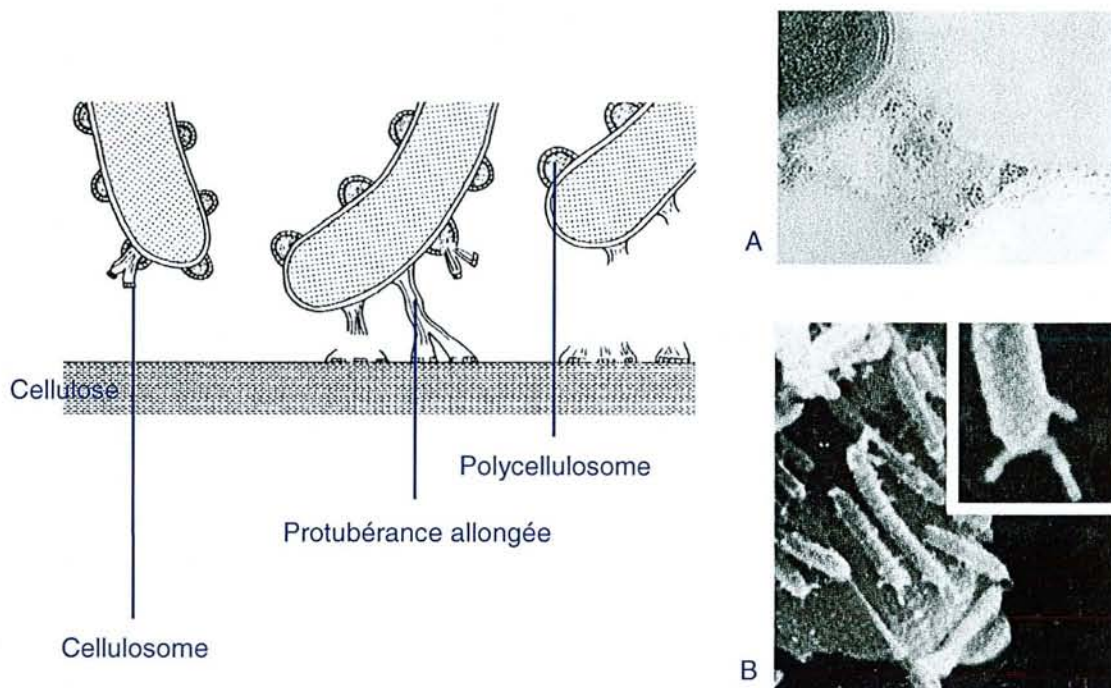


Figure 13 : Schéma de l'adhésion de *Clostridium thermocellum* sur une fibre de cellulose d'après les images obtenues (A) en microscopie électronique par transmission et (B) en microscopie électronique à balayage. Sur la photo A, la cellule en haut (noir) est reliée à la cellulose en bas (blanc) par une protubérance allongée. Sur la photo B, des cellules adhèrent à une fibre de cellulose, l'encart montre une cellule avec des protubérances allongées (Adapté de Lamed et Bayer, 1988a et de Shoham *et al.*, 1999).

différents domaines cD, présents sur CipA, et dD, présentés par les cellulases. Par contre, le domaine dDII du cellulosome reconnaît spécifiquement et uniquement un domaine de cohésion modifié et appelé cDII (Shoham *et al.*, 1999). Ce domaine fait partie de protéines d'ancrage membranaire qui contiennent trois domaines homologues à la couche S appelés domaines SLH (S-layer homology) (Figure 14). Trois protéines d'ancrage membranaire du cellulosome ont jusqu'à présent été caractérisées : SdbA, Orf2P et OlpB (Leibovitz *et al.*, 1997). Une autre protéine d'ancrage membranaire, OlpA, ne possède pas de domaine cDII en N-terminal, mais un domaine cDI ce qui suggère qu'elle permet la liaison individuelle de cellulases cellulosomales *via* leur domaine dDI (Salamitou *et al.*, 1994). Le domaine CBD du CipA se lie de manière réversible à la cellulose et possède une faible spécificité d'adhésion à la structure cristalline de la cellulose.

Le cellulosome est glycosylé, principalement au niveau de CipA, des résidus galactopyranose sont liés aux résidus thréonine des régions riches en proline, thréonine et sérine qui relient les différents modules cD de CipA (Gerwig *et al.*, 1993). Ces glycosylations pourraient avoir un rôle de protection du cellulosome contre les protéases, intervenir lors de la liaison du complexe à la cellulose ou encore lors de la reconnaissance et de l'assemblage des différents modules protéiques constitutifs du cellulosome (Schwarz, 2001a).

La formation du cellulosome est induite lors de la croissance sur cellulose ou cellobiose et sa composition en unités catalytiques varie selon la nature du substrat (Bhat *et al.*, 1993). 23 gènes de composants catalytiques cellulosomaux ont jusqu'à présent été isolés chez *Clostridium thermocellum* (Schwarz, 2001a) ; outre les gènes d'exoglucanases, de cellobiohydrolases et d'endoglucanases (Guglielmi et Béguin, 1998 ; Kataeva *et al.*, 1999 ; Kruus *et al.*, 1995 ; Zverlov *et al.*, 1999), une lichenase, une chitinase, une mannase et des xylanases ont aussi été isolés et caractérisés (Halstead *et al.*, 1999 ; Hayashi *et al.*, 1999 ; Schwarz, 2001a). Certains de ces gènes sont regroupés en cluster mais la plupart sont dispersés sur le chromosome de *Clostridium thermocellum* (Guglielmi et Béguin, 1998).

II.3. Le cellulosome chez les autres bactéries

Clostridium cellulolyticum fait partie des clostridia possédant un système cellulastique organisé sous forme de cellulosome. Cette bactérie appartient au même cluster que *Clostridium thermocellum* cependant la structure du cellulosome et l'arrangement des gènes cellulosomaux sont différents.

Le cellulosome de *Clostridium cellulolyticum* forme une structure extrêmement stable de 600 kDa qui est plus petite et moins complexe que celle de *Clostridium thermocellum* (Madarro *et al.*, 1991) ; les protubérances formées par ces cellulosomes n'excèdent pas 16 MDa (Gal *et al.*, 1997).

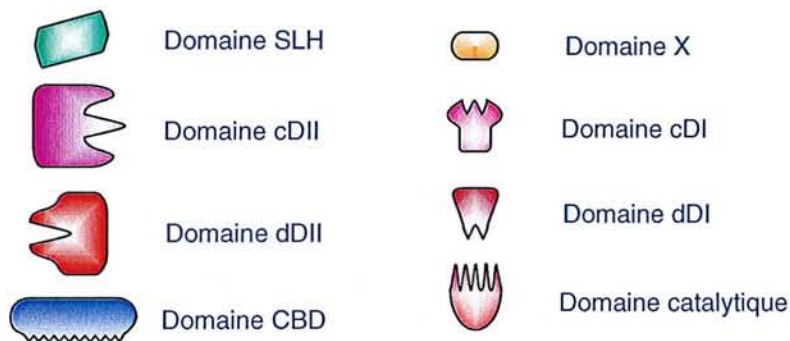
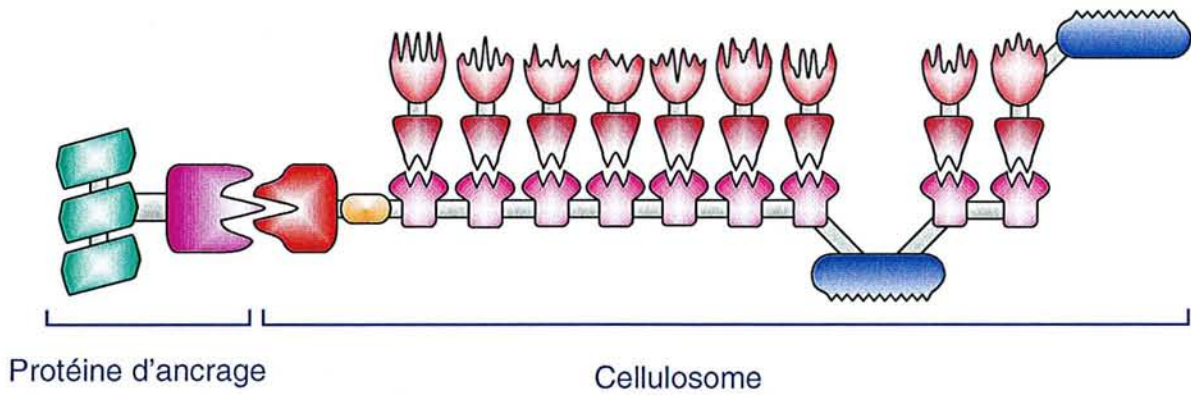


Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation du cellulosome de *Clostridium thermocellum* (Adapté de Shoham *et al.*, 1999). SLH (S-layer homology) : domaine homologue à la couche S ; cD (cohesin domain) : domaine de cohésion ; dD (dockerin domain) : domaine d'arrimage ; I : protéine impliquée dans la liaison entre les cellulases et le cellulosome ; II : protéine impliquée dans la liaison entre la protéine d'ancrage membranaire et le cellulosome ; CBD (cellulose-binding domain) : domaine de liaison à la cellulose ; X : domaine hydrophile.

Lorsque la cellule croît sur xylane, le complexe contient des xylanases en plus des cellulases (Mouhand-Oussaid *et al.*, 1999). Cependant aucun gène de xylanase n'a pour l'instant été isolé.

Plusieurs composants de ce cellulosome ont été caractérisés, leurs gènes clonés, séquencés et exprimés dont 6 endoglucanases, CelA, CelC, CelD, CelE, CelF et CelG (Bagnara-Tardif *et al.*, 1992 ; Bélaïch *et al.*, 1997 ; Fierobe *et al.*, 1991, 1993 ; Reverbel-Leroy *et al.*, 1996, 1997 ; Shima *et al.*, 1991) ainsi que la protéine d'échafaudage CipC (Pagès *et al.*, 1999). Toutes les structures primaires des endoglucanases déduites de la séquence de leur gène contiennent un domaine cDI. D'autre part, certaines cellulases telles que CelD, CelE et CelG possèdent un domaine CBD. Une différence frappante existe entre le cellulosome de *Clostridium cellulolyticum* et celui de *Clostridium thermocellum* quant à l'organisation des gènes codant les composants du cellulosome ; alors que ces gènes sont dispersés dans le génome de *Clostridium thermocellum*, les gènes codant les composants du cellulosome de *Clostridium cellulolyticum* sont regroupés au sein d'un cluster de 16 kb (Bagnara-Tardif *et al.*, 1992 ; Bélaïch *et al.*, 1997).

Tandis que l'analyse par l'ADN ribosomique 16S montre que *Clostridium thermocellum* et *Clostridium cellulolyticum* appartiennent au même cluster (Collins *et al.*, 1994), une analyse basée sur les séquences codant les domaines cD et dD montre une séparation très nette entre les espèces mésophiles et thermophiles (Bélaïch *et al.*, 1997 ; Pagès *et al.*, 1999). L'hypothèse la plus probable est que cette différence reflète l'influence de la température de croissance sur l'évolution de la structure des complexes celluloseux.

CipC a une organisation structurale très différente de CipA ; CipC possède huit domaines cDI, deux domaines X et un domaine CBD (Pagès *et al.*, 1999) (Figure 15). Le domaine dDII est absent, ce qui suggère un mode de fixation à la surface de la bactérie différent de celui observé chez *Clostridium thermocellum* mais jusqu'à présent inconnu. OrfXp est une protéine, possédant un domaine cDI, qui présente par ailleurs des similarités structurales avec la protéine d'ancrage OlpA trouvée chez *Clostridium thermocellum* (Pagès *et al.*, 1999) ; ceci a permis de formuler l'hypothèse selon laquelle OrfXp serait une protéine fixée à la paroi et participant à l'assemblage du cellulosome de *Clostridium cellulolyticum*. Une autre possibilité d'attache du cellulosome à la surface cellulaire a été envisagée par l'intermédiaire des domaines hydrophiles X (Mosbah *et al.*, 2000) ; cependant, aucune des deux hypothèses n'a encore pu être confirmée expérimentalement.

Clostridium cellulovorans n'appartient pas au même cluster que *Clostridium thermocellum* et *Clostridium cellulolyticum* (Figure 9, 10). Le cellulosome de cette bactérie a une masse moléculaire de 1 MDa qui est intermédiaire entre les cellulosomes de *Clostridium thermocellum* et de *Clostridium cellulolyticum*. La protéine d'échafaudage appelée CbpA contient neuf domaines cDI, quatre domaines X et un domaine CBD (Doi *et al.*, 1998) (Figure 15). Comme chez *Clostridium cellulolyticum*, les gènes du cellulosome sont organisés en un seul cluster dans lequel se trouvent des endoglucanases comme

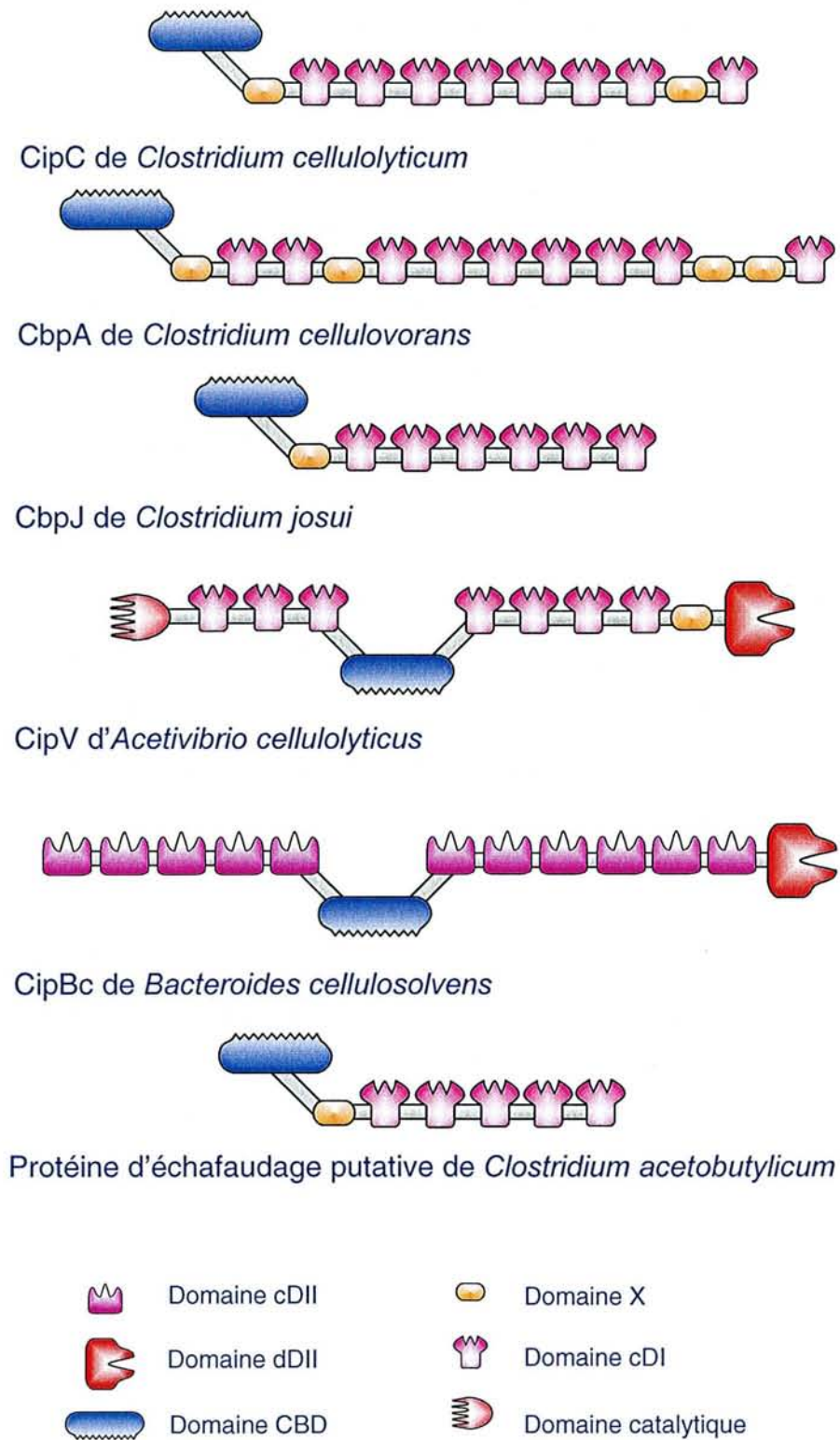


Figure 15 : Représentation schématique de la structuration des différentes protéines d'échafaudage de cellulosome jusqu'à présent caractérisées (Adapté de Schwarz, 2001a).

EngE, des exoglucanases comme ExgX ou encore une protéine HbpA très similaire à la protéine OrfXp trouvée chez *Clostridium cellulolyticum* (Tamaru et Doi, 1999 ; Tamaru *et al.*, 2000).

CbpJ, la protéine d'échafaudage du cellulosome de *Clostridium josui*, possède six domaines cDI, un domaine X et un domaine CBD (Kakiuchi *et al.*, 1998) (Figure 15). Les gènes de deux endoglucanases, CelA et CelB, et d'une exoglucanase CelD ont jusqu'à présent été isolés. CelA présente la particularité de posséder un domaine SLH, ce qui suggère que l'attachement du cellulosome à la paroi bactérienne se fait par l'intermédiaire de cette cellulase.

Acetivibrio cellulolyticus possède une protéine d'échafaudage CipV inhabituelle (Figure 15) qui contient sept domaines cDI, un domaine CBD, un domaine dDII et en N-terminale un domaine catalytique GHF 9 (Ding *et al.*, 1999). C'est la seule protéine d'échafaudage caractérisée à ce jour qui contient un domaine catalytique.

Bacteroides cellulosolvens est une bactérie phylogénétiquement proche d'*Acetivibrio cellulolyticus* et récemment reclassée dans la famille *Clostridiaceae* (Lin *et al.*, 1994). La protéine d'échafaudage de son cellulosome, CipBc, contient un domaine CBD, un domaine dDII et de manière assez surprenante 11 domaines cDII similaires à ceux trouvés chez *Clostridium thermocellum* dans les protéines SdbA, Orf2P et OlpB (Ding *et al.*, 2000) (Figure 15).

Le dernier cellulosome décrit est celui trouvé lors du séquençage complet du génome de *Clostridium acetobutylicum* (Nollings *et al.*, 2001). Aucune souche de cette espèce n'a jamais été décrite comme cellulolytique auparavant. Ce cellulosome putatif contiendrait cinq domaines cDI, un domaine CBD et un domaine dDII (Schwarz, 2001a) (Figure 15). Ces gènes ne peuvent pas, pour la plupart, être exprimés en raison de décalages du cadre de lecture et de la dégénérescence des séquences promotrices (Nollings *et al.*, 2001).

Chez les principales bactéries du rumen étudiées, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Fibrobacter succinogenes*, aucun gène de protéine d'échafaudage n'a encore été isolé (Miron *et al.*, 2001). Par contre chez *Ruminococcus albus* trois endoglucanases, EngV, EngVI et EngVII, ont été isolées tandis qu'une endoglucanase EndA a été isolée chez *Ruminococcus flavefaciens* (Schwarz, 2001a) et dans chacune de ces cellulases un domaine dDI a pu être identifié. Chez *Fibrobacter succinogenes* différents domaines de liaison à la cellulose ainsi que des endoglucanases ont été identifiés mais aucune cellulase jusqu'ici isolée ne semble posséder de domaine de type dDI ou dDII (Mitsumori *et al.*, 1996 ; Mitsumori et Minato, 2000 ; Béra-Maillet *et al.*, 2000a, 2000b).

D. La fermentation de la cellulose par les clostridia

En tant qu'organochimiohétérotrophe les clostridia de type saccharolytique, dont font partie les cellulolytiques, tirent leur énergie et leurs précurseurs biosynthétiques de la dégradation et de l'oxydation de substrats carbonés. Un schéma général du métabolisme carboné chez les clostridia est représenté en Figure 16. En tant que bactéries Gram positives à bas pourcentage en bases G+C, les clostridia et les bactéries dites lactiques, comme celles des genres *Streptococcus* ou *Lactobacillus*, partagent certaines régulations métaboliques (Russell *et al.*, 1996).

Les biopolymères, telles que la cellulose, sont préalablement dégradés extracellulairement en composés assimilables par la cellule. Ces composés solubles, monomériques ou oligomériques, entrent dans la cellule par des systèmes de transport membranaires pour être ensuite métabolisés par des enzymes cytoplasmiques (Mitchell *et al.*, 1995) (Figure 16).

Les hexoses sont pris en charge par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas conduisant à la production de pyruvate avec formation de deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) et de deux molécules d'adénosine triphosphate (ATP) par hexose catabolisé. A ce stade, le pyruvate, qui est un métabolite intermédiaire commun à une large variété de substrats, est dirigé vers différentes voies fermentaires généralement après une oxydation sous forme d'acétyl-CoA *via* la ferrédoxine (Fd) (Mitchell, 1998).

Une interaction critique existe entre le flux carboné et le flux d'électrons ; l'altération de ce dernier pouvant avoir un effet marqué sur la nature des produits finaux formés (Girbal *et al.*, 1995a, 1995b). Chez les clostridia, le métabolisme anaérobie étant de type fermentaire, l'ATP est généré par phosphorylation du substrat et les accepteurs finaux d'électrons sont des molécules organiques dont la nature est caractéristique de chaque espèce bactérienne. Cette capacité à former une large gamme de produits de fermentation dote les clostridia d'un haut degré de flexibilité permettant aux flux métaboliques d'être ajustés et optimisés en réponse aux changements de conditions de l'environnement (Mitchell, 1998).

I. Les systèmes de transport du substrat carboné

Suite à la dégradation de la cellulose, les glucides solubles libérés sont directement assimilables par la cellule. Ils comprennent du glucose et des cellodextrines solubles comprenant de 2 à 7 résidus glucose c'est-à-dire du cellobiose, du celotriose, du cellotetraose, du cellopentaose, du cellohexaose et du celloheptaose. Ces substrats sont transportés par des protéines membranaires puis intègrent les voies métaboliques générales. Chez les clostridia, le transport des substrats carbonés est relativement

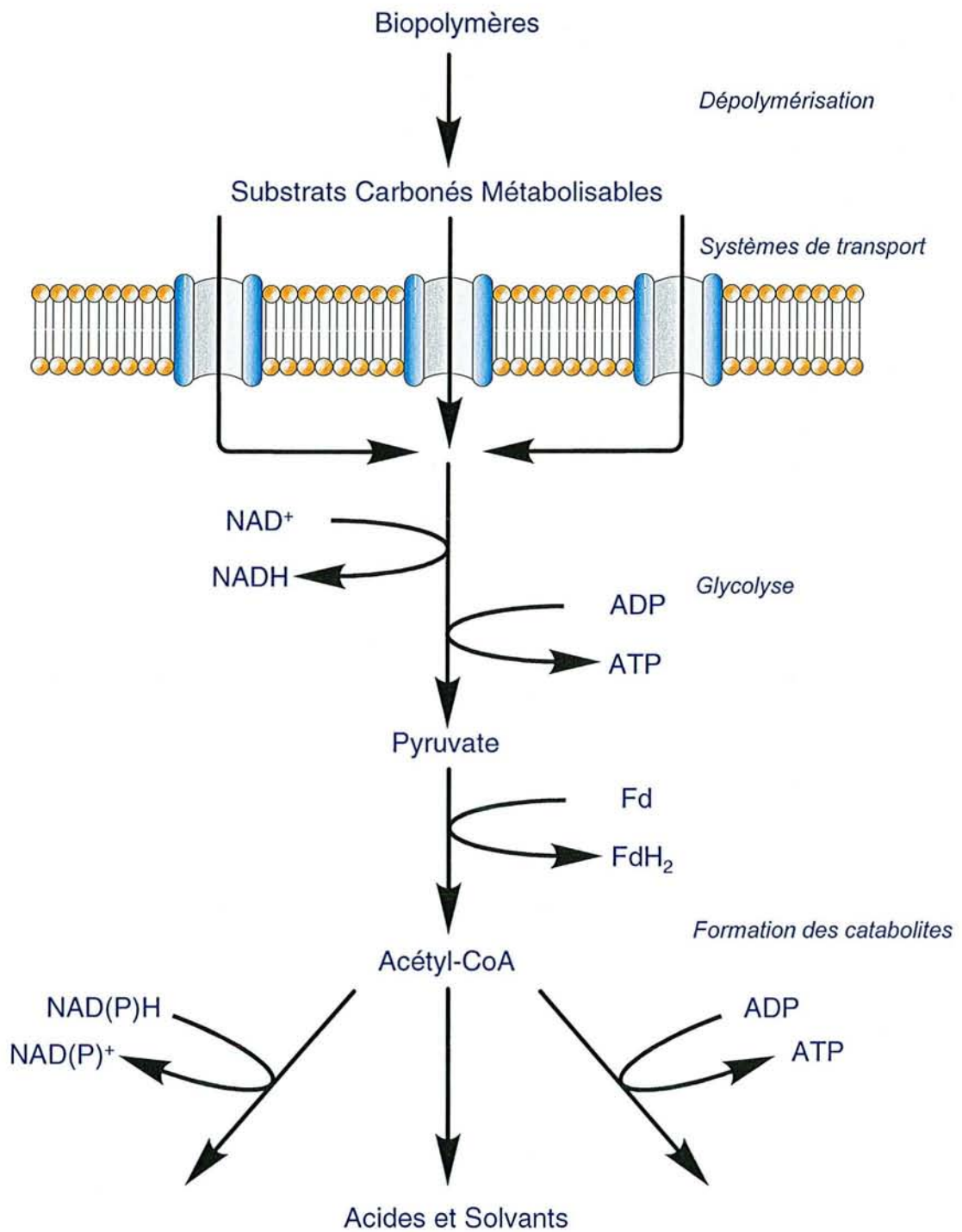


Figure 16 : Schéma général du métabolisme de conversion des substrats carbonés en acides et solvants chez les clostridia (Adapté de Mitchell, 1998).

peu étudié. Cependant, les études réalisées ont montré que les mécanismes sont similaires à ceux rencontrés chez la plupart des bactéries (Mitchell *et al.*, 1995 ; Mitchell, 1998). Chez les clostridia cellulolytiques l'essentiel des connaissances sur cet aspect de la physiologie bactérienne résulte des études menées sur *Clostridium thermocellum*.

I.1. Le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate

Le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate ou PTS fut à l'origine découvert chez *Escherichia coli* au milieu des années soixante (Kunding *et al.*, 1966). Par la suite, il fut mis en évidence chez un grand nombre d'espèces bactériennes mais il n'a encore jamais été détecté chez des organismes eucaryotiques (Galinier, 2000).

Ce système transmembranaire catalyse le transport du substrat par translocation de groupe, du milieu extracellulaire vers le cytoplasme, par la formation d'une chaîne de transfert d'un groupement phosphate (Meadow *et al.*, 1990 ; Postma *et al.*, 1993). En effet, après sa fixation au récepteur, le substrat est transporté à travers la membrane plasmique et phosphorylé à partir du PEP *via* différents intermédiaires phosphoprotéiques (Figure 17).

Lors de la première étape de ce processus, le PEP transfère son groupement phosphate à l'enzyme I (EI) qui à son tour phosphoryle une protéine riche en histidine appelée HPr. La phospho-HPr transfère ce groupement phosphate à l'enzyme IIA (EIIA) qui elle-même le transfère à l'enzyme IIB (EIIB). Quant à l'enzyme IIC (EIIC), qui est toujours une protéine intégrée dans la membrane, elle n'est pas phosphorylée mais elle fixe le substrat carboné, catalyse sa phosphorylation à partir du phosphate fourni par EIIB et permet sa translocation dans le cytoplasme de manière concomitante.

EI et HPr sont des protéines cytoplasmiques exprimées constitutivement qui participent au transport de tous les substrats du système PTS. Les enzymes II sont au contraire spécifiques d'un substrat ; leur synthèse est induite en présence du substrat phosphorylé. Par ailleurs, en fonction du substrat mais aussi de l'espèce bactérienne l'organisation de ce système diffère ; ainsi EIIA et EIIB peuvent être soit indépendantes soit fusionnées, EIIB peut être fusionné avec EIIC ou les trois partenaires EIIA, EIIB et EIIC peuvent être fusionné ensemble.

Malgré cette organisation moléculaire variable, le principe de transport du substrat reste identique chez toutes les espèces bactériennes, par contre les modes de régulations de ce système diffèrent notamment chez les bactéries à bas pourcentage en base G+C (Stülke et Hillen, 1998, 1999). Un tel mécanisme de transport permet de réaliser deux étapes métaboliques, la translocation et la

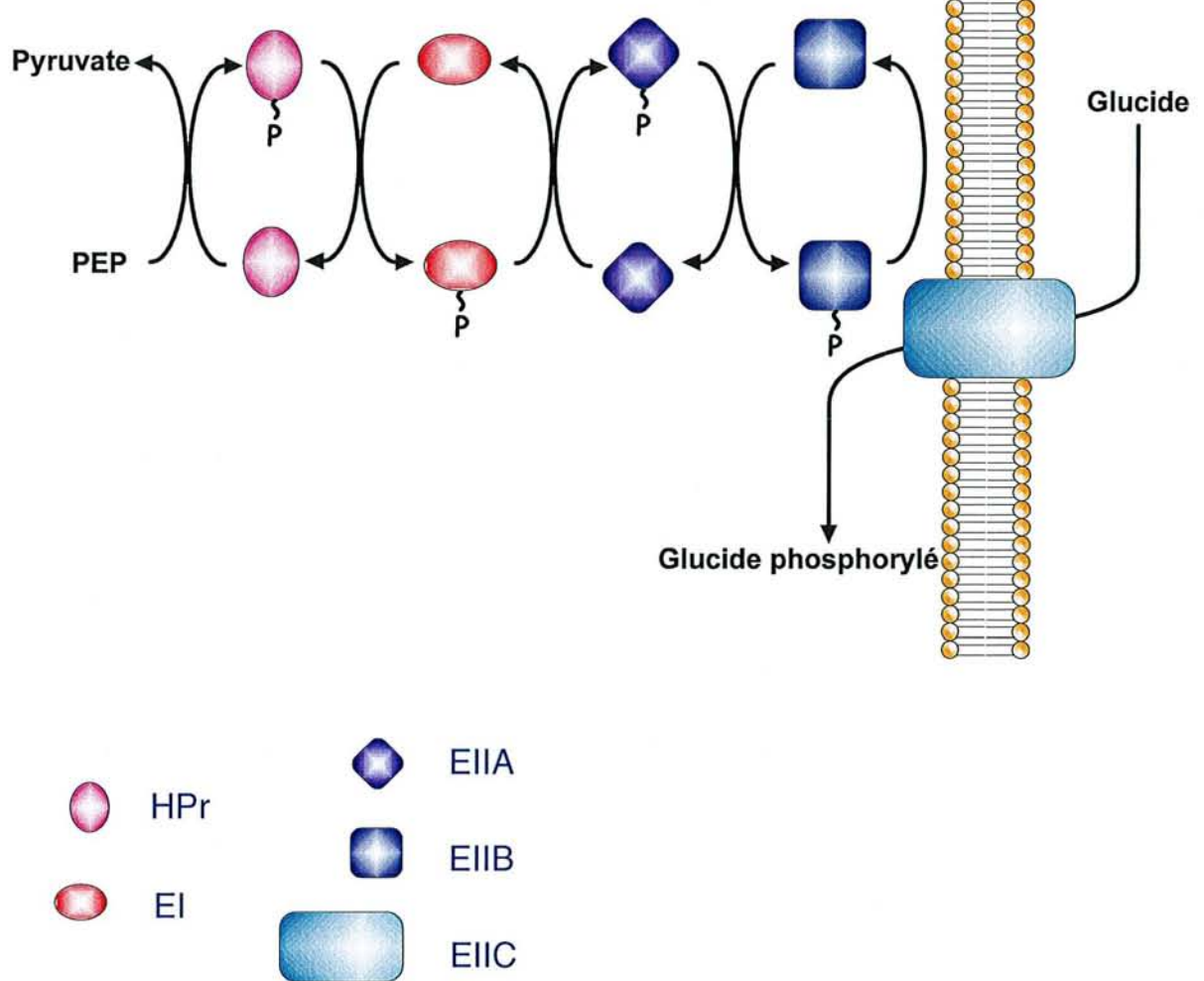


Figure 17 : Le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate (PTS) bactérien (Adapté de Herzberg et Klevit, 1994).

phosphorylation, en ne consommant qu'une seule fois de l'énergie ce qui est un avantage en particulier chez les bactéries anaérobies fermentaires où les rendements énergétiques sont plus faibles que chez les bactéries aérobies.

Chez les clostridia, comme *Clostridium pasteurianum* ou *Clostridium acetobutylicum*, la phosphorylation PEP dépendante est impliquée lors du transport du glucose, du fructose ou encore du mannitol (Mitchell, 1998). Chez *Clostridium thermocellum*, ce système existe pour le transport du fructose et du mannitol, qui ne sont pas des produits d'hydrolyse de la cellulose, par contre il ne semble pas mis à contribution pour le transport glucose ou du cellobiose (Mitchell, 1998). Pour ces derniers substrats, c'est un système de transport non-PTS qui est utilisé.

I.2. Les systèmes de transport non-PTS

En plus du système PTS, plusieurs autres types de transport peuvent être présents chez les clostridia. Contrairement au système PTS, ces autres types de transport n'entraînent pas de modification chimique du substrat lors du transport vers l'intérieur de la cellule.

Le système le plus simple mais aussi relativement rare chez les bactéries est la diffusion facilitée. Dans ce mode de transport, c'est le gradient de concentration créé entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule qui entraîne un flux de substrat entrant. Ce système ne nécessite aucune dépense d'énergie, cependant la vitesse de transport est plus élevée que par simple diffusion passive puisque l'entrée du substrat dans la cellule est facilitée par une protéine membranaire. Chez les clostridia, le glycérol est l'un des rares substrats à être transporté de cette façon, notamment chez *Clostridium pasteurianum* (Booth, 1976). Chez *Clostridium thermohydrosulfuricum*, le glucose et le xylose sont eux aussi transportés par diffusion facilitée et c'est le seul autre exemple où un substrat différent du glycérol est transporté par ce mécanisme chez les clostridia.

Le transport H⁺-dépendant est un type de transport actif qui s'appuie sur la force proton motrice générée par un gradient de proton. Le métabolisme des clostridia étant de type fermentaire, il n'existe pas de chaîne de transport d'électrons, par contre les ATPase membranaires sont présentes (Mitchell et Moyle, 1965). Celles-ci fonctionnent uniquement dans le sens de l'extrusion des protons avec hydrolyse d'ATP et contribuent ainsi à créer un gradient transmembranaire de protons (Riebelling et Jungermann, 1976). Chez *Clostridium pasteurianum*, le galactose et le gluconate sont transportés à travers la membrane plasmique de cette façon (Booth et Morris, 1975) ; c'est le seul exemple où ce type de transport a été clairement démontré (Mitchell, 1998).

Chez les clostridia le transport actif sans modification du substrat serait davantage de type ATP-dépendant que H⁺-dépendant (Mitchell, 1998). Bien que la grande majorité des systèmes de transport

ATP-dépendant n'ait pas été caractérisée, il est très probable que ces systèmes appartiennent à la super-famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) (Higgins, 1992 ; Schneider et Hunke, 1998). Ce système, ubiquitaire chez tous les organismes vivants, forme une classe extrêmement diverse de protéines de transport membranaire qui couplent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP au passage de solutés à travers la membrane plasmique. Ce système n'est pas limité à l'incorporation de substrats, il est aussi largement impliqué dans des processus biologiques variés tels que la transduction de signaux, la sécrétion de protéines ou encore la résistance aux antibiotiques (Higgins, 1992).

Un transporteur ABC a généralement une organisation modulaire. Il est composé de quatre domaines (Schneider et Hunke, 1998) (Figure 18) :

- deux sont hydrophobes et membranaires. Ils sont impliqués dans la translocation du substrat à travers la membrane.
- deux sont hydrophiles et cytoplasmiques. Ces derniers sont impliqués dans l'hydrolyse d'ATP et fournissent l'énergie nécessaire au transport du substrat, ils sont aussi appelés domaine ABC.

Ces domaines peuvent être exprimés sous formes de polypeptides indépendants ou fusionnés. Ainsi chez les eucaryotes l'ensemble de ces domaines se retrouvent sous un seul et même polypeptide (Figure 18III) alors que chez les bactéries les domaines sont plutôt individualisés (Figure 18I), plus rarement, les domaines hydrophobes sont fusionnés aux domaines ATPasiques (Figure 18II).

La configuration I de la Figure 18, est le système le mieux connu (Boos et Lucht, 1996). Il correspond aux transporteurs impliqués dans l'importation des substrats solubles chez les bactéries. Une protéine extracellulaire impliquée dans la réception du substrat est systématiquement présente et unique à cette configuration. Dans certains cas les domaines membranaires ou les domaines ABC peuvent être fusionnés (Schneider et Hunke, 1998).

La configuration II de la Figure 18 est plutôt présente dans les systèmes d'exportation chez les bactéries, quant à la configuration III, elle est exclusivement rencontrée chez les eucaryotes (Schneider et Hunke, 1998).

Chez *Clostridium thermocellum*, le glucose et les cellodextrines seraient incorporés par la cellule grâce à un transporteur ABC (Mitchell, 1998). En effet, il s'avère que la phosphorylation de ces composés se produit de manière intracellulaire et que les activités phosphorylantes ne sont pas détectées au niveau de la membrane mais dans le cytosol. Ce serait donc l'ATP qui fournirait la force motrice nécessaire à l'assimilation du glucose et des cellodextrines (Strobel *et al.*, 1995) (Figure 19). Ces travaux ont montré que des cellodextrines, ayant jusqu'à cinq résidus glucose, entrent dans la cellule sans être hydrolysées au passage de la membrane. Les cellodextrines sont alors dégradées par

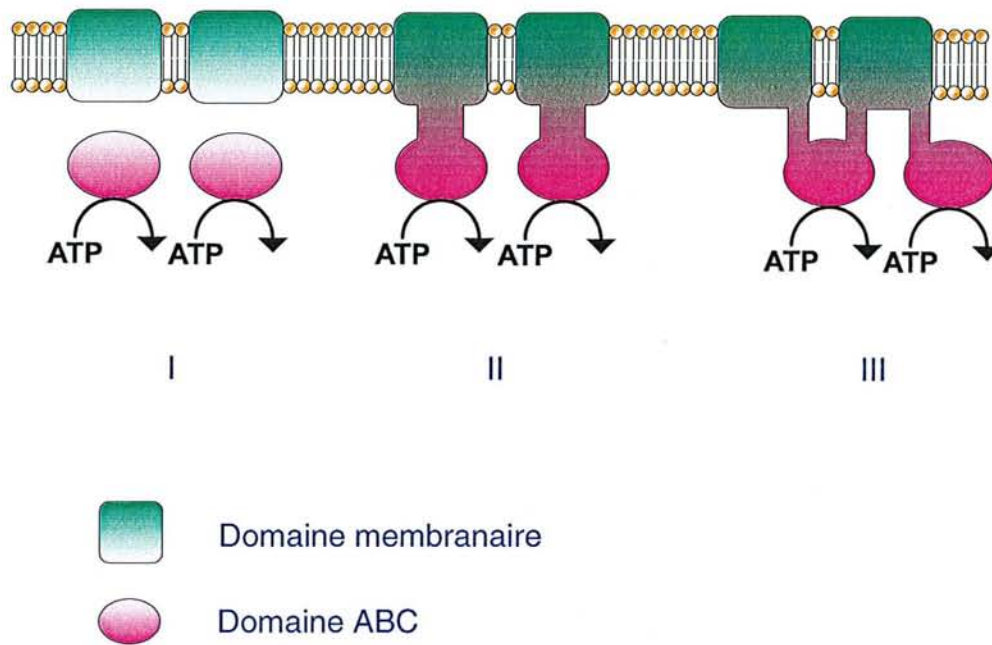


Figure 18 : Représentation schématique des trois types de transporteurs ABC (Adapté de Schneider et Hunke, 1998).

les activités cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20) et cellodextrine phosphorylase (EC 2.4.1.49) avant de rejoindre la glycolyse et le métabolisme général (Arai *et al.*, 1994 ; Tanaka *et al.*, 1995) (Figure 19). Le transport transmembranaire et l'utilisation par les cellodextrines phosphorylases de cellodextrines solubles de plus grande taille, c'est-à-dire de cellohexaose et de celloheptaose, n'ont pas pu être vérifiés, ces cello-oligosaccharides sont en effet très difficiles à obtenir (Pereira *et al.*, 1988). Chez *Ruminococcus albus*, il a pu être montré que le cellohexaose pouvait être le substrat de la cellodextrine phosphorylase présente chez cette bactérie (Lou *et al.*, 1997). Ainsi, l'incorporation et la phosphorylation intracellulaire des cellodextrines solubles aussi grandes que le celloheptaose ne peut être exclue chez les clostridia cellulolytiques (Mitchell, 1998).

Bien qu'aucune stœchiométrie entre le glucide transporté et l'ATP hydrolysé n'ait pu être établie, la structure des transporteurs ABC suggère une dépense énergétique de deux molécules d'ATP hydrolysées par molécule de substrat transportée, soit une molécule d'ATP par domaine ABC. La présence d'activités cellodextrines phosphorylases, qui génère au final du glucose et du glucose 1-phosphate, en aval des transporteurs permettrait de compenser la dépense énergétique liée à la translocation du substrat, l'avantage énergétique étant proportionnel à la taille de la cellodextrine transportée (Mitchell, 1998 ; Strobel *et al.*, 1995). Cet avantage énergétique se vérifie en terme de rendement ; le rendement molaire de croissance de *Clostridium thermocellum* est en effet deux fois plus élevé sur cellobiose que sur glucose (Ng et Zeikus, 1982).

II. Les voies du catabolisme carboné chez les clostridia

Après leur assimilation par la cellule, les substrats carbonés sont convertis en intermédiaires de voies métaboliques. Le flux carboné emprunte la glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) où il est alors partagé entre les voies anaboliques et les voies cataboliques génératrices d'énergie.

Chez les clostridia, la voie EMP est la voie d'oxydation principale des hexoses en pyruvate. Elle permet la génération d'ATP, de NADH ainsi que de nombreux intermédiaires métaboliques requis pour les biosynthèses. Les enzymes de la voie EMP sont constitutives, les niveaux d'activités pouvant être toutefois soumis à des variations significatives (Fraenkel et Vinopal, 1973 ; Hommes, 1966). Ces enzymes sont toutes réversibles exceptées trois d'entre elles : l'hexokinase (EC 2.7.1.1), la phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) et la pyruvate kinase (EC 2.7.1.40). La phosphofructokinase, la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) et la pyruvate kinase sont très impliquées dans la régulation de la voie EMP :

- La phosphofructokinase est généralement inhibée par un excès de PEP ou d'ATP alors que l'AMP et l'ADP l'activent (Gottschalk, 1986 ; Sanwal, 1970).

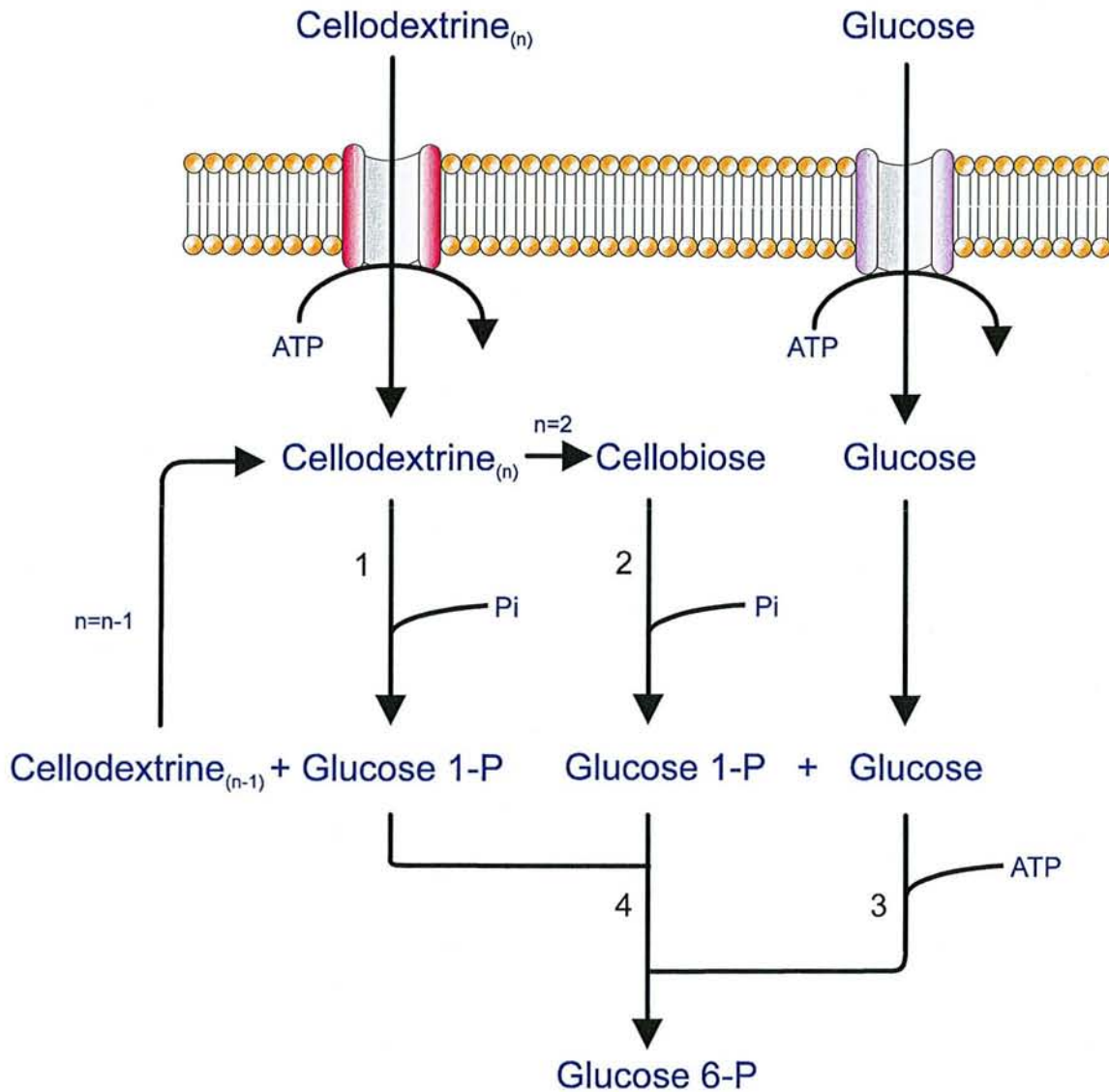


Figure 19 : Schéma du modèle du système de transport et de phosphorylation des substrats carbonés issus de la cellulolyse chez *Clostridium thermocellum* (Adapté de Strobel *et al.*, 1995). n : degré de polymérisation, 1 : Cellodextrine phosphorylase (EC 2.4.1.49), 2 : Cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20), 3 : Hexokinase (EC 2.7.1.1), 4 : Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2).

- La GAPDH catalyse la conversion du glycéraldéhyde 3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate avec réduction d'un NAD^+ en NADH. Le composé obtenu est aussitôt converti en 3-phosphoglycérate par la 3-phosphoglycérate kinase avec formation concomitante d'une molécule d'ATP par déphosphorylation du substrat. Enzyme réversible, la GAPDH peut rapidement devenir une étape limitante dans le sens de la glycolyse lorsque le rapport intracellulaire NADH/NAD^+ est augmenté (Garrigues *et al.*, 1997 ; Girbal et Soucaille, 1994).
- La pyruvate kinase convertit le PEP en pyruvate avec transfert du groupement phosphoryl vers l'ADP pour former de l'ATP. Cette enzyme est généralement activée par le fructose 1,6-diphosphate et par l'AMP (Maeba et Sanwal, 1968 ; Wieker et Hess, 1971). L'AMP exerce un contrôle positif sur l'activité de la pyruvate kinase, ce qui permet de rétablir l'équilibre énergétique de la cellule en stimulant la vitesse de synthèse d'ATP, tandis qu'un excès d'ATP inhibe cette réaction (Sanwal, 1970).

En tant que bactéries anaérobies strictes ayant un métabolisme fermentaire, les espèces du genre *Clostridium* sont dépourvues de chaînes respiratoires. Pour assurer leur croissance, elles associent une production d'énergie couplée à l'oxydation du substrat carboné en pyruvate au cours de la glycolyse et une régénération des coenzymes réduits issus de la glycolyse en utilisant le pyruvate comme accepteur final d'électrons et en réorientant ces électrons vers la production d'hydrogène lorsque cela s'avère nécessaire. Les voies du catabolisme du carbone et les réactions de transfert d'électrons sont ainsi étroitement liées.

II.1. Le flux électronique

Lors de la glycolyse, du NADH est généré, puis une seconde oxydation se produit lors de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA par la pyruvate-Fd oxydoréductase (PFO) (EC 1.2.7.1) avec formation de ferrédoxine réduite (FdH_2) (Figure 20). La PFO est une enzyme très répandue chez les clostridia (Kerscher et Oesterhelt, 1982). La ferrédoxine est un transporteur physiologique d'électrons ; elle transporte deux électrons avec un très bas potentiel d'oxydoréduction, ce qui lui permet de participer aux réactions d'oxydoréduction difficiles telles que la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA et CO_2 , la réduction du NAD^+ et NADP^+ ou encore la réduction des protons en H_2 (Loach, 1970 ; Mortenson *et al.*, 1962 ; Valentine, 1964).

Cette réaction thioclastique, convertissant le pyruvate en acétyl-CoA a un rôle pivot dans le métabolisme puisque l'acétyl-CoA généré peut être dirigé vers les embranchements fermentaires spécialisés, menant à la synthèse d'acides comme l'acétate ou encore de solvants comme l'éthanol (Rogers et Gottschalk, 1993), mais aussi vers les voies anaboliques comme celles des acides gras

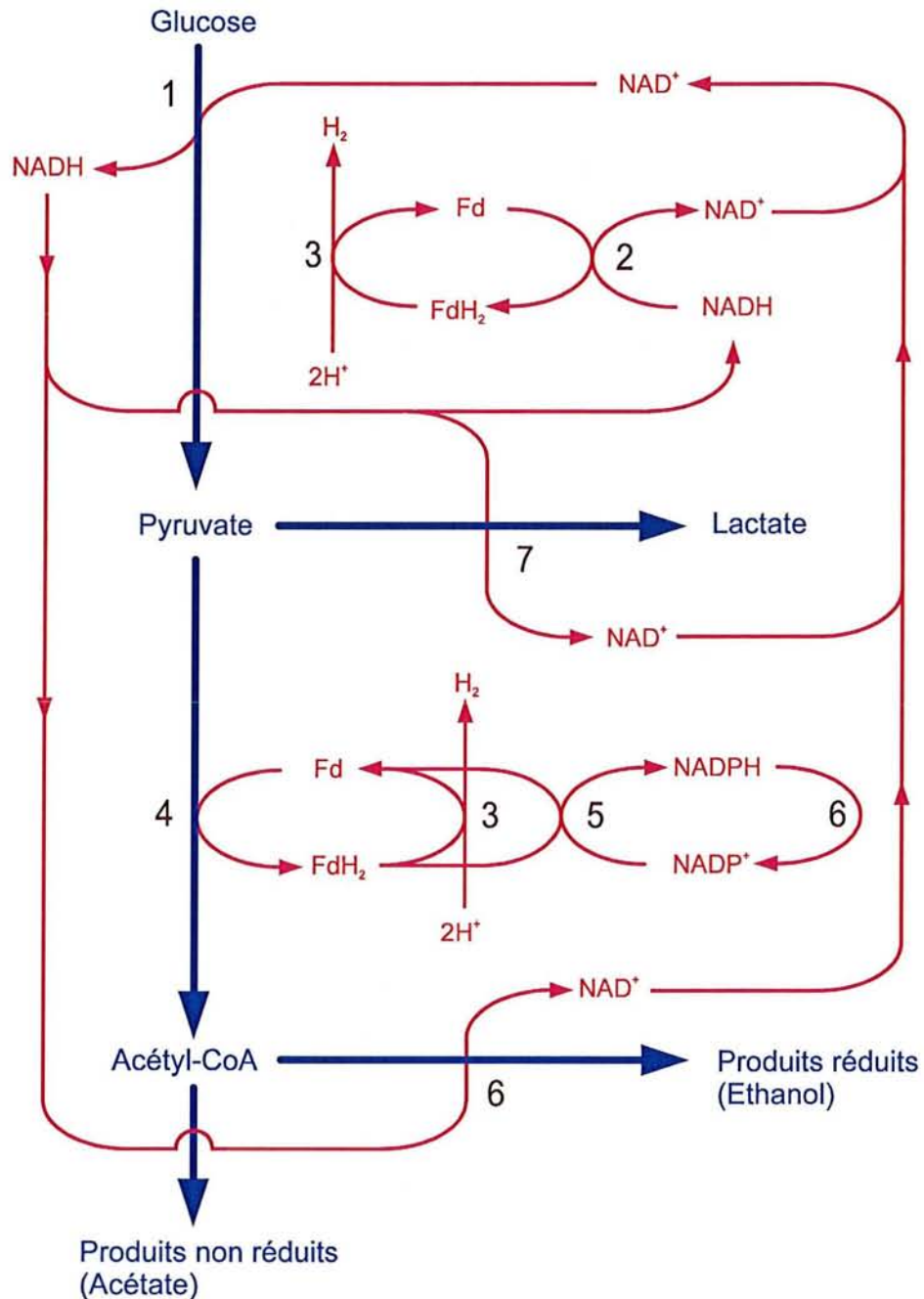


Figure 20 : Schéma général des interactions entre les voies du flux carboné (fléchage bleu) et celles du flux d'électrons (fléchage rouge) (Adapté de Mitchell, 1998). 1 : GAPDH (EC 1.2.1.12), 2 : NADH-Fd oxydoréductase (EC 1.18.1.3), 3 : Hydrogénase (EC 1.18.99.1), 4 : PFO (EC 1.2.7.1.), 5 : NADPH-Fd oxydoréductase (EC 1.18.1.2), 6 : Déshydrogénase NAD(P)H dépendante (EC 1.18.1.2), 7 : LDH (EC 1.1.1.27).

(Magnuson *et al.*, 1995). Par ailleurs, les électrons peuvent être transférés depuis la FdH₂ vers trois autres oxydoréductases (Figure 20) :

- La Fd-H⁺ oxydoréductase ou hydrogénase (EC 1.18.99.1) permet d'ajuster le flux des électrons chez les clostridia. Cette protéine fer-soufre catalyse la formation de dihydrogène à partir de 2 protons et de 2 électrons⁻ *via* la ferrédoxine, ainsi que sa réaction inverse (Adams *et al.*, 1981, 1984, 1989).
- La NADPH-Fd oxydoréductase (EC 1.18.1.2) génère du NADPH nécessaire aux biosynthèses cellulaires (Jungermann *et al.*, 1973 ; Petitdemange, 1976). Une des caractéristiques des espèces appartenant au genre *Clostridium* est l'absence d'une activité glucose 6-phosphate déshydrogénase productrice de NADPH (Rogers, 1986). Ainsi, la fonction anabolique de la NADPH-Fd oxydoréductase est importante puisqu'elle est la seule source de NADPH dont disposent les cellules (Jungermann *et al.*, 1969, 1971 ; Thauer *et al.*, 1969, 1971). Par ailleurs, l'activité catalytique dans le sens de l'oxydation du NADPH est faible (Jungermann *et al.*, 1973).
- La NADH-Fd oxydoréductase (EC 1.18.1.3) est capable d'oxyder le NADH ou de réduire le NAD⁺ ; la fonction catabolique de cette enzyme est essentielle. L'activité réversible de l'enzyme permet à la cellule de s'adapter aux conditions de culture, si la cellule a besoin d'un complément de NADH, le flux des électrons est canalisé *via* la NADH-Fd oxydoréductase pour la réduction du coenzyme tandis que dans des conditions d'excès de NADH issu de la glycolyse, ce dernier est réoxydé et les électrons dirigés vers l'hydrogénase (Girbal et Soucaille, 1994). Pour la régénération du nicotinamide dinucléotide oxydé, l'acétyl-CoA est requis comme activateur ; la réaction de réduction du NAD⁺ est quant à elle inhibée par le NADH (Petitdemange *et al.*, 1976). Cette régulation de la NADH-Fd oxydoréductase par le NADH permet à l'enzyme de fonctionner en relation avec la GAPDH et de contrôler les teneurs en NAD⁺ et en NADH dans la cellule. L'activité spécifique de la NADH-Fd oxydoréductase fonctionne préférentiellement dans le sens de l'oxydation du NADH (Petitdemange *et al.*, 1971a, 1971b).

Ces réactions de transferts d'électrons nécessitent des potentiels d'oxydoréduction très faibles et sont donc très sensibles à l'oxygène. L'interconnexion entre le flux d'électrons généré par ces enzymes et le flux carboné chez les clostridia est schématisé dans la Figure 20.

La réaction phosphoroclastique, qui consiste en une décarboxylation oxydative du pyruvate pour former de l'acétyl-phosphate, du CO₂ et de l'H₂ (Mortlock *et al.*, 1959), fait intervenir trois activités : la PFO, l'hydrogénase et la phosphotransacétylase (EC 2.3.1.8). Cette réaction phosphoroclastique a longtemps été considérée comme une étape clef du métabolisme intermédiaire du pyruvate chez les espèces du genre *Clostridium*. Cependant cette activité ne prend en compte que

le flux carboné dirigé vers la formation de l'acétyl-phosphate pour la synthèse ultérieure d'acétate et d'ATP, elle n'est donc pas représentative du carrefour métabolique entre le flux carboné et le flux des électrons qui est plutôt situé au niveau de la réaction thioclastique.

En considérant l'avantage énergétique pour la cellule de convertir tout l'acétyl-CoA en acétate en générant de l'ATP, il apparaît que le NADH issu de la glycolyse devrait être réoxydé par la formation de dihydrogène via la Fd, mais l'accumulation de dihydrogène conduit à une inhibition de l'hydrogénase forçant ainsi la cellule à produire d'autres composés réduits.

La réduction du pyruvate en lactate chez certaines espèces est un moyen alternatif de régénération du NAD⁺ (Figure 19). Ainsi, chez *Lactococcus lactis*, un rapport NADH/NAD⁺ élevé est activateur de la lactate déshydrogénase (LDH) (EC 1.1.1.27), qui constitue une voie de délestage du flux carboné consommatrice de NADH (Garrigues *et al.*, 1997).

II.2. L'orientation du flux carboné

A la suite de la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA, ce dernier est pris en charge par diverses voies enzymatiques spécialisées, soit dans la régénération des coenzymes réduits issus de la glycolyse comme la voie de formation de l'éthanol, soit dans la synthèse d'ATP supplémentaire comme la voie de production de l'acétate. La répartition du flux carboné dans les différents embranchements peut présenter de nombreuses combinaisons en fonction des besoins cellulaires et de la complexité du métabolisme branché.

Les études consacrées à la physiologie de *Clostridium acetobutylicum* ont permis de dégager les grands principes qui régissent la distribution du carbone et des électrons dans les différents embranchements métaboliques chez les clostridia (Jones et Woods, 1986). La distribution de ces flux chez *Clostridium acetobutylicum* représente un modèle de flexibilité métabolique (Chen, 1993). De récentes études ont montré que l'organisme généralement référencé comme *Clostridium acetobutylicum*, pouvait être divisé en quatre clusters génétiquement distincts (Jonhson *et al.*, 1997 ; Keis *et al.*, 1995 ; Wilkinson *et al.*, 1995), les informations disponibles sur le métabolisme de ce micro-organisme sont donc en fait représentatives de différents groupes taxonomiques. Malgré ces variations génétiques, les régulations physiologiques mises en place lors de la fermentation acétonobutylique restent globalement similaires (Jonhson *et al.*, 1997).

Plusieurs clostridia forment de l'éthanol comme produit majeur de leur catabolisme. *Clostridium thermocellum* est une bactérie cellulolytique thermophile qui concentre la plupart des travaux consacrés à l'analyse métabolique chez les clostridia cellulolytiques. Les connaissances disponibles sur la fermentation alcoolique des substrats cellulosiques par *Clostridium thermocellum* sont loin d'égalier

celles acquises chez les solvantogènes ; néanmoins, les mécanismes de régulations physiologiques communs à l'ensemble des clostridia sont nombreux (Rogers, 1986 ; Rogers et Gottschalk, 1993 ; Mitchell, 1998).

II.2.1. *Clostridium acetobutylicum* : modèle de la fermentation acétono-butylique

Deux phases distinctes caractérisent la fermentation acétono-butylique (Davies et Stephenson, 1941 ; Spivey, 1978) (Figure 21) :

- la phase acidogène correspond à la phase exponentielle de croissance du micro-organisme. C'est au cours de cette période que sont produits l'acétate, le butyrate ainsi que l'H₂ et le CO₂. L'acétyl-CoA, issu de la décarboxylation thioclastique du pyruvate, conduit soit à l'acétate, soit au butyrate. L'acétate est formé *via* une phosphotransacétylase (EC 2.3.1.8) et une acétate kinase (EC 2.7.2.1) avec production d'une molécule d'ATP par acétate formé. Deux molécules d'acétyl-CoA peuvent aussi être condensées en acétoacétyl-CoA par une thiolase (EC 2.3.1.9). Puis la β-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase (EC 1.1.1.157), la crotonase (EC 4.2.1.55) et la butyryl-CoA déshydrogénase (EC 1.3.99.2), catalysent la formation de butyryl-CoA à partir d'acétoacétyl-CoA (Andersch *et al.*, 1983). Le butyryl-CoA est ensuite converti en butyrate *via* une phosphotransbutyrylase (EC 2.3.1.19) et une butyrate kinase (EC 2.7.2.7) conduisant globalement à la production d'une molécule d'ATP et à l'oxydation de deux molécules de NADH en NAD⁺. Le rendement énergétique de production du butyrate est inférieur à celui de l'acétate puisqu'une seule molécule d'ATP est produite pour deux molécules d'acétyl-CoA condensés contre un ATP par acétyl-CoA pour l'acétate.
- la phase solvantogène apparaît lorsque la croissance du micro-organisme est ralentie lors de l'entrée en phase stationnaire. Un basculement métabolique s'effectue alors vers la formation de solvants : butanol, acétone et éthanol avec les proportions approximatives de 6:3:1. Durant cette phase, la production d'hydrogène décline et une partie des acides est reconsommée (Girbal *et al.*, 1995b ; Girbal et Soucaille, 1998). L'acétoacétyl-CoA:acyl-CoA transférase ou CoA transférase (EC 2.8.3.8) convertit l'acétoacétyl-CoA en acétoacétate, sa spécificité très large permettant la réassimilation aussi bien de l'acétate que du butyrate pendant la phase solvantogène (Hartmanis *et al.*, 1984 ; Wiesenborn *et al.*, 1989). L'acétoacétate décarboxylase (EC 4.1.1.4) conduit ensuite à la formation d'acétone et de CO₂ à partir d'acétoacétate. Les aldéhydes et alcools déshydrogénases sont quant à elles responsables de la formation d'éthanol et de butanol (Andersch *et al.*, 1983 ; Dürre *et al.*, 1987).

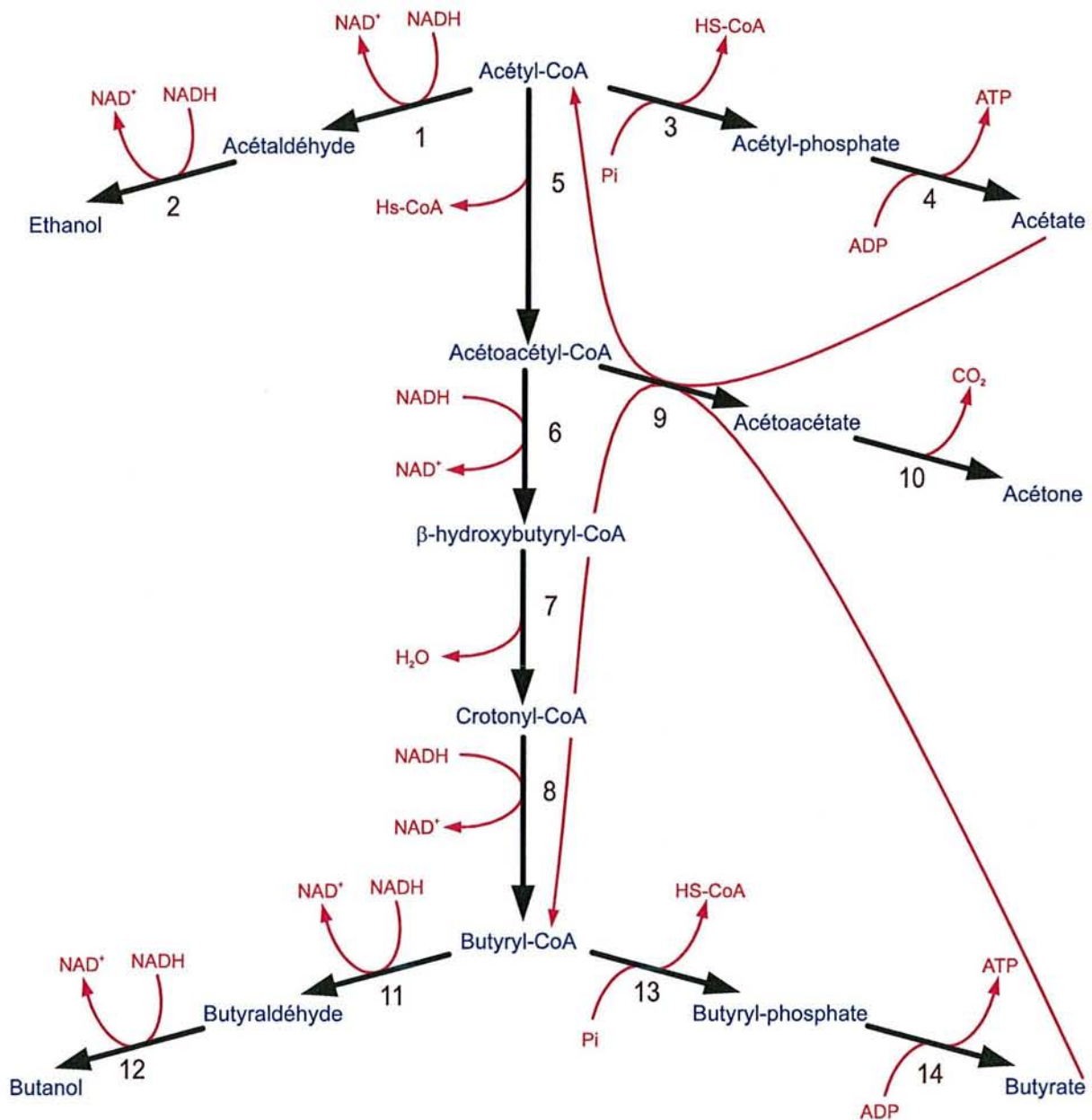


Figure 21 : La fermentation acétono-butylque chez *Clostridium acetobutylicum* (Adapté de Girbal et Soucaille, 1998). 1 : Acétaldéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.10), 2 : Alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1), 3 : Phosphotransacétylase (EC 2.3.1.8), 4 : Acétate kinase (EC 2.7.2.1), 5 : Acétoacétyl-CoA thiolase (EC 2.3.1.9), 6 : β -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase (EC 1.1.1.157), 7 : Crotonase (EC 4.2.1.55), 8 : Butyryl-CoA déshydrogénase (EC 1.3.99.2), 9 : Acétoacétyl-CoA:acyl-CoA transférase (EC 2.8.3.8); 10 : Acétoacétate décarboxylase (EC 4.1.1.4), 11 : Butyraldéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.57), 12: Butanol déshydrogénase (EC 1.1.1.1 ou 1.1.1.2), 13 : Phosphotransbutyrylase (EC 2.3.1.19); ; 14 : Butyrate kinase (EC 2.7.2.7).

Le basculement métabolique de la production des acides vers la production de solvants se traduit par un coût énergétique important pour la cellule. En dépit des différences génétiques existantes entre les différentes souches de *Clostridium acetobutylicum*, un consensus a émergé sur les facteurs impliqués dans la formation des solvants.

La conséquence primaire de la production des acides, acétate et butyrate, pendant la phase exponentielle de croissance de *Clostridium acetobutylicum* est la chute du pH. Un pH bas couplé à de fortes concentrations en acides sont considérés comme les facteurs les plus importants pour l'induction de la solvantogénèse (Mitchell, 1998). La formation des solvants est associée à une réassimilation d'acétate et de butyrate. La solvantogénèse peut être aussi interprétée comme un mécanisme de limitation de la toxicité des acides (Gottschall et Morris, 1981). Une corrélation fut mise en évidence entre la concentration intracellulaire d'acide butyrique couplée à un pH extracellulaire faible d'environ 5 et l'induction de la production de solvants (Girbal *et al.*, 1995a ; Hüsemann et Papoutsakis, 1989 ; Monot *et al.*, 1984 ; Terraciano et Kashket, 1986). En effet, l'acidogénèse se traduit par une chute du pH extracellulaire parallèlement à une diminution du pH intracellulaire limitée (Huang *et al.*, 1986). Dans ces conditions, l'accumulation du butyrate intracellulaire est favorisée puisqu'il se trouve en proportion importante sous forme non dissociée à l'extérieur de la cellule, la forme non dissociée étant la seule capable de diffuser passivement à travers la membrane (Terraciano et Kashket, 1986 ; Hüsemann et Papoutsakis, 1989).

Deux types de signaux seraient à l'origine de la formation des solvants (Girbal et Soucaille, 1998) :

- le premier signal apparaîtrait à la suite de la production des acides et de la baisse du pH. La translocation des protons *via* l'ATPase membranaire augmenterait afin de maintenir le Δ pH, entraînant une diminution de la concentration en ATP et une augmentation de l'ADP. Ce changement du rapport ATP/ADP induirait la synthèse de la CoA transférase ainsi que l'acétoacétate décarboxylase qui forment l'acétone aux dépens des acides. L'acétyl-CoA étant détourné par la voie de l'acétone, il ne peut alimenter la voie du butyrate ce qui augmente le pool intracellulaire de NADH (Grupe et Gottschalk, 1992).
- cette augmentation du pool de NADH constitue le deuxième signal induisant la synthèse de la butyraldéhyde déshydrogénase et de la butanol déshydrogénase (Grupe et Gottschalk, 1992). Par ailleurs, ce rapport NADH/NAD⁺ élevé inhibe l'activité GAPDH dans le sens de la glycolyse ce qui entraînerait en retour une baisse de la production d'ATP (Girbal et Soucaille, 1994). La présence de faibles concentrations en ATP intracellulaire aurait une incidence négative sur la transcription de la phosphotransbutylase et de la butyrate kinase (Girbal et Soucaille, 1994).

Le phénomène d'induction de la solvantogénèse est un processus très certainement multifactoriel dont les bases moléculaires ne sont pas encore entièrement connues (Nair *et al.*, 1999 ; Ravagnani *et al.*, 2000).

II.2.2. La fermentation de la cellulose par *Clostridium thermocellum*

Clostridium thermocellum rassemble l'essentiel des travaux publiés sur le métabolisme fermentaire des clostridia cellulolytiques (Halzwood et Gilbert, 1993 ; Mitchell, 1998). De nombreuses souches sont référencées comme appartenant à l'espèce *Clostridium thermocellum*. Parmi les plus étudiées citons la souche ATCC 27405 (McBee, 1950) et son mutant AS39 (Shinmyo *et al.*, 1979), LQ8 (Vidrine et Quinn, 1969), la souche LQRI ou ATCC 35609 qui fut réisolée à partir de la souche LQ8 (Lamed et Zeikus, 1980) ou encore la souche JW20 déposée à l'ATCC sous le numéro 31549 (Freier *et al.*, 1988). Bien qu'aucune étude phylogénique n'ait été entreprise, il est communément admis que ces différentes souches sont phénotypiquement proches (Halzwood et Gilbert, 1993 ; Mitchell, 1998). Notons cependant que des contradictions existent au sujet de certaines propriétés physiologiques comme l'utilisation des différentes sources carbonées (Nochur *et al.*, 1990).

A partir des métabolismes caractérisés chez les clostridia, un schéma général des voies de dégradation des substrats celluloseux a été proposé pour *Clostridium thermocellum* (Patni et Alexander, 1971 ; Lamed et Zeikus, 1980 ; Ng *et al.*, 1977) (Figure 22). Sur la base de la détection des activités fructose 1,6-diphosphate aldolase et glucokinase, il fut admis que *Clostridium thermocellum* catabolisait le glucose *via* la voie d'EMP. Par la suite, les activités PFO, phosphotransacétylase, acétate kinase, éthanol déshydrogénase et hydrogénase furent détectées et permirent de compléter les voies cataboliques (Lamed et Zeikus, 1980). Les produits majeurs du catabolisme de la cellulose sont l' H_2 et le CO_2 , l'acétate, l'éthanol et de faibles quantités de lactate (Weimer et Zeikus, 1977). Ainsi la majorité du pyruvate formé est convertie en acétyl-CoA tandis qu'une faible partie est réduite en lactate sur une autre branche métabolique. L'acétyl-CoA peut être réduit en acétaldéhyde puis en éthanol avec régénération de NAD^+ ou bien former de l'acétate avec génération d'ATP. Les proportions des différents catabolites diffèrent selon les souches et les conditions expérimentales notamment le rapport éthanol/acétate dont la valeur varie de 0,8 à 2,0 (Lamed et Zeikus, 1980 ; Lamed *et al.*, 1988).

Lors de la formation d'éthanol en excès, la cellule doit transférer une quantité significative d'électrons de la ferrédoxine réduite *via* la NADH-Fd oxydoréductase au NAD^+ ce qui permet la formation d'éthanol supplémentaire et une réduction de la quantité d' H_2 formé par mole d'hexoses métabolisée (Lamed et Zeikus, 1980). Ainsi, la présence d'une activité NADH-Fd oxydoréductase dans le sens de réduction du NAD^+ en NADH dans certaines souches a permis d'envisager l'amélioration du

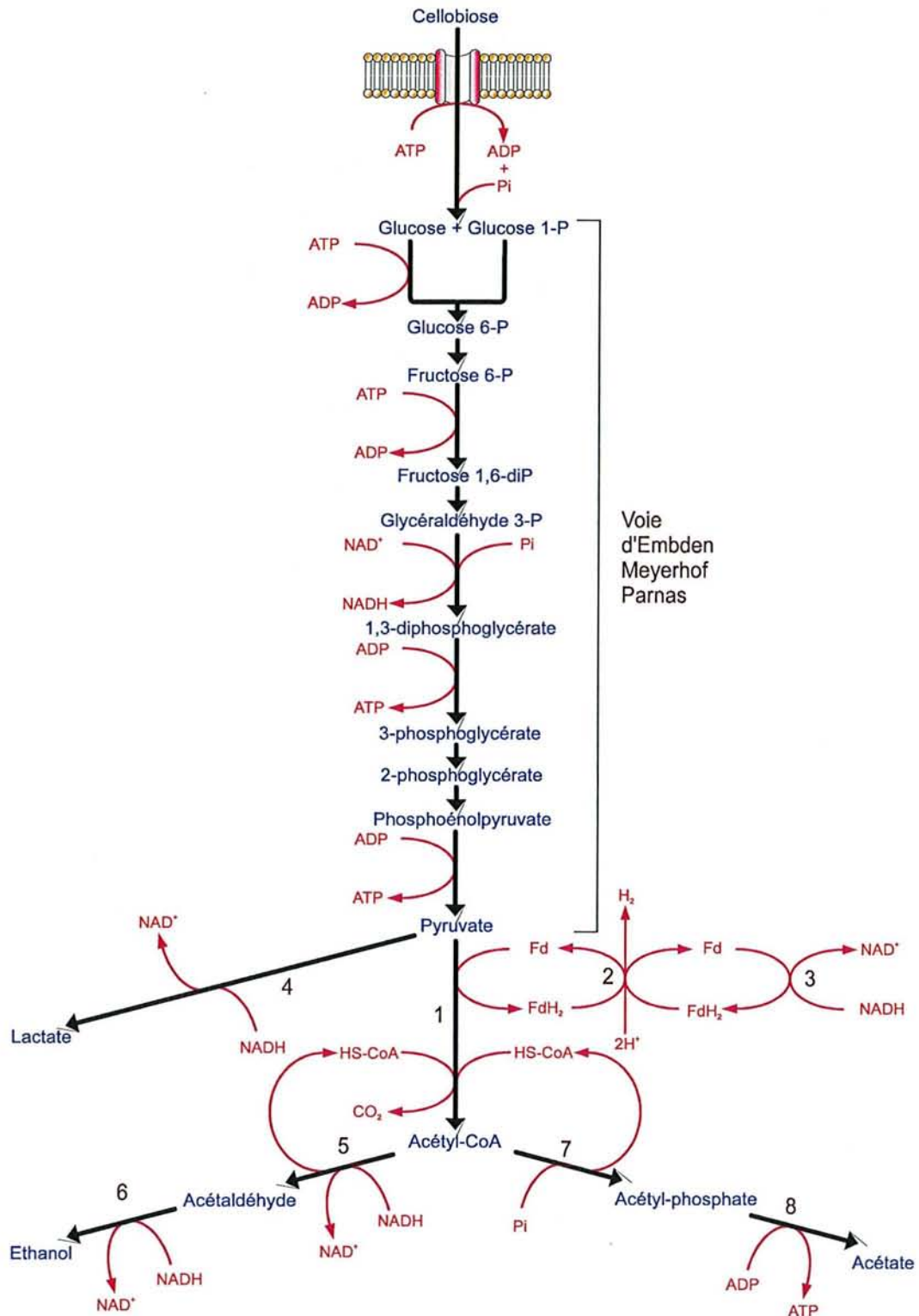


Figure 22 : La fermentation acétate-éthanol du cellobiose par *Clostridium thermocellum* (Adapté de Lamed et Zeikus, 1980). 1 : PFO (EC 1.2.7.1), 2 : Hydrogénase (EC 1.18.99.1); 3 : NADH-Fd oxydoréductase (EC 1.18.1.3), 4 : Lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27), 5 : Acétaldéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.10), 6: Alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1), 7: Phosphotransacétylase (EC 2.3.1.8), 8: Acétate kinase (EC 2.7.2.1).

rapport éthanol/acétate. L'ajout de dihydrogène à l'atmosphère anaérobie d'une culture de la souche AS39 possédant cette activité améliore le rapport éthanol/acétate de 1,2 à 2,0, mais cela est sans effet sur la souche LQRI pour laquelle seule une faible activité NADH-Fd oxydoréductase est détectée (Lamed et Zeikus, 1980). Cette dernière souche possède uniquement une éthanol déshydrogénase NAD⁺-dépendante et le NADPH néoformé *via* l'hydrogénase et la NADPH-Fd oxydoréductase est sans effet.

Clostridium thermocellum est hautement spécialisé pour une croissance sur cellulose et les cellodextrines en particulier le cellobiose. La croissance de cette bactérie sur glucose ou fructose comme seule source de carbone est difficile et ne se produit qu'après une longue phase de latence (Nochur *et al.*, 1992). La proportion entre les différents produits de fermentation varie selon le mode de croissance imposé au micro-organisme. Chez *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 la production d'éthanol par rapport à celle de l'acétate est plus importante en culture discontinue qu'en culture continue (Lynd *et al.*, 1989a). Cette différence serait à mettre sur le compte du dispositif de culture lui-même ; la culture en batch s'effectuant en fiole fermée par une capsule étanche, les gaz de fermentation sont maintenus sous pression, tandis que dans une culture continue, ils sont évacués par un courant d'azote qui évite toute accumulation d'H₂.

La première étude métabolique rationnelle sur substrats solubles et en culture continue ne fut paradoxalement effectuée que très récemment au regard de l'importance biotechnologique du micro-organisme (Strobel, 1995). Il apparaît que les rendements molaires de croissance exprimés en grammes de bactéries par mole de substrat consommé sont supérieurs sur cellobiose à ceux obtenus sur glucose (Ng et Zeikus, 1982). D'autre part, l'augmentation du rendement serait fonction de la taille de la cellodextrine et s'expliquerait par la présence d'une activité cellobiose et cellodextrine phosphorylase (Strobel *et al.*, 1995). Quant aux produits de fermentation, leurs vitesses de formation varient selon la vitesse spécifique de croissance (μ), le rapport éthanol/acétate étant très inférieur à 1 aux taux de croissance faibles, puis augmentant pour des valeurs de μ plus élevées. Ce résultat serait la conséquence de la maintenance cellulaire dont le coût énergétique se fait davantage ressentir aux taux de croissance faibles (Russell et Cook, 1995).

L'ensemble de ces résultats indique que les différentes souches de *Clostridium thermocellum* présentent une flexibilité métabolique importante afin de répondre à la fois aux impératifs énergétiques et à la nécessité du catabolisme anaérobie d'éliminer les électrons issus de l'oxydation du substrat. L'ensemble de ces résultats est à considérer avec prudence pour deux raisons : malgré le développement d'un milieu synthétique (Johnson *et al.*, 1981), la majorité des études métaboliques a été effectuée sur un milieu complexe contenant jusqu'à 5 g/l d'extrait de levure ce qui ne reflète pas forcément les performances optimales du catabolisme, et, par ailleurs, des contaminations éventuelles par plusieurs souches de *Clostridium thermocellum* voire par d'autres micro-organismes ne peuvent *a posteriori* pas être exclues (Mitchell, 1998).

E. La physiologie de *Clostridium cellulolyticum*

Clostridium cellulolyticum, initialement désignée souche H10, est une bactérie cellulolytique isolée à partir d'un compost d'herbe (Petitdemange *et al.*, 1984) (Figure 23). Il s'agit d'un bacille à la forme légèrement incurvée et aux extrémités arrondies. Il mesure 3,0 à 6,0 μm de long pour 0,6 à 1,0 μm de large. Les cellules sont mobiles grâce à des flagelles péritriches. Ce micro-organisme :

- est Gram positif avec un pourcentage en base G+C de 41%,
- est anaérobie strict,
- ne réduit pas les sulfates,
- ne possède pas de catalase,
- forme des endospores terminales déformantes.

Ces caractéristiques sont celles des bactéries du genre *Clostridium* (Petitdemange *et al.*, 1984). Les analyses génétiques ultérieures ont permis de préciser sa position phylogénétique et de classer *Clostridium cellulolyticum* dans le cluster III du genre *Clostridium* (Collins *et al.*, 1994). Ce micro-organisme est mésophile puisqu'il possède une température optimale de croissance comprise entre 32 et 35°C, avec une température de croissance minimale de 25°C et maximale de 45°C. Il fermente la cellulose, le cellobiose et le glucose et plus faiblement l'arabinose, le fructose, le galactose, le mannose, le ribose et le xylose. Lors de la fermentation de la cellulose, du glucose et principalement du cellobiose sont libérés (Petitdemange *et al.*, 1984).

I. Les études en culture discontinue

Les premières études métaboliques ont permis de montrer que l'acétate, le lactate et l'éthanol étaient les produits majeurs de la fermentation de la cellulose (Giallo *et al.*, 1983). Un rendement de croissance plus élevé sur cellobiose que sur glucose a été mis en évidence ; ce résultat est à mettre en parallèle avec ceux obtenus chez *Clostridium thermocellum* où une différence de rendement molaire de croissance avait déjà été observée entre ces deux substrats (Ng et Zeikus, 1982). Par ailleurs, chez *Clostridium cellulolyticum* une activité cellobiose phosphorylase a été détectée (Giallo, 1984). Tout ceci suggère fortement qu'un mécanisme d'incorporation du glucose et des cellodextrines similaire à celui de *Clostridium thermocellum* existe chez *Clostridium cellulolyticum* (Strobel *et al.*, 1995).

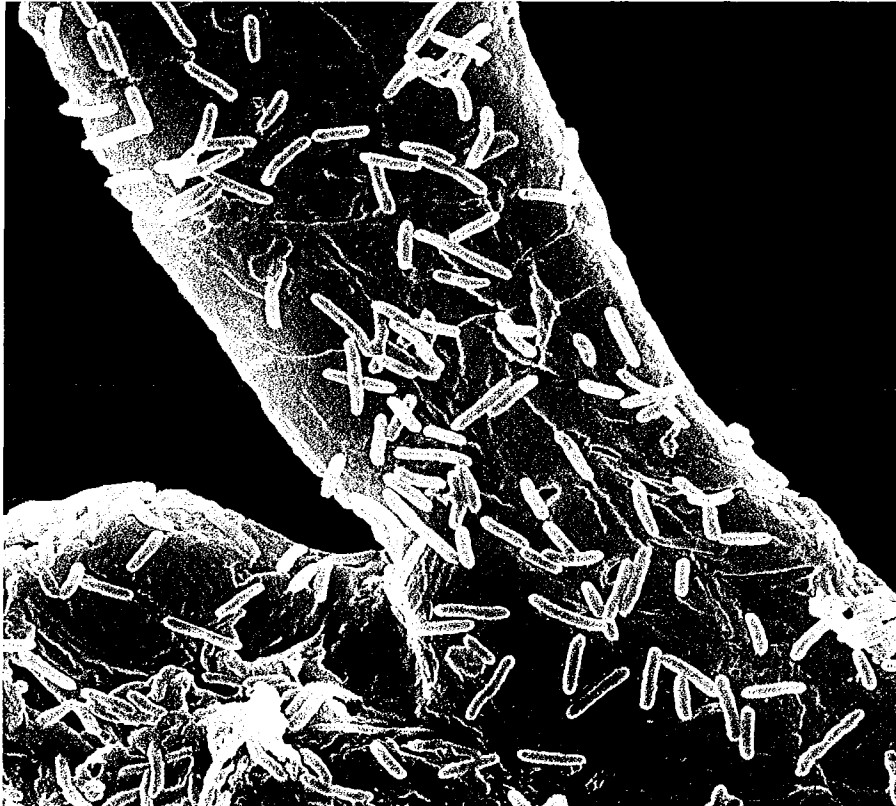


Figure 23 : Photographie en microscopie électronique à balayage de *Clostridium cellulolyticum* en croissance sur une fibre de cellulose.

Ces premières études en culture discontinue ont révélé très rapidement une inhibition précoce de la croissance (Giallo *et al.*, 1983). Cet arrêt de croissance s'accompagne d'une production de lactate et d'une accumulation de glucides qui ne semblent être ni du glucose ni du cellobiose mais plutôt des exopolysaccharides. La consommation du substrat carboné est très modeste puisqu'elle est de seulement de 1 à 2 g.l⁻¹ de cellobiose en comparaison des 30 à 100 g.l⁻¹ de glucose que peuvent consommer les clostridia saccharolytiques telles que *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium butyricum* (Jones et Woods, 1986). Les causes possibles de l'inhibition de croissance ont été recherchées sans toutefois être identifiées, en effet, cette inhibition précoce de la croissance de *Clostridium cellulolyticum* n'était pas le résultat de l'accumulation des produits de fermentations ni du pH puisque le contrôle de ce dernier ne semble avoir aucune influence sur la croissance (Giallo *et al.*, 1983). Il fut suggéré que ce phénomène était la conséquence d'une limitation nutritionnelle et le milieu de culture qui contenait déjà 5 g/l d'extrait de levure fut enrichi considérablement par des mélanges d'acides aminés, de peptides et de vitamines ; toutefois, les rendements de croissance ne furent pas améliorés. Un résultat surprenant fut obtenu lors de cultures en dialyse (Gehin *et al.*, 1996b), dans lesquelles la densité cellulaire était 10 fois plus importante qu'en culture discontinue classique. Ce résultat suggérait qu'un composé inhibiteur de la croissance était éliminé lors de la culture en dialyse ce qui était en contradiction avec les résultats précédents (Giallo *et al.*, 1983).

Ces premiers résultats obtenus sur cellobiose ont pu être transposés sur cellulose, notamment l'inhibition précoce de croissance (Giallo *et al.*, 1985). L'entrée des cellules en phase stationnaire s'accompagne ici d'une accumulation en glucides solubles essentiellement du glucose. Les temps de génération sont aussi plus longs, puisqu'ils passent de 7 h sur cellobiose à 24 h sur cellulose. Par ailleurs, les rendements de production en lactate, acétate et éthanol sont plus faibles. La vitesse de dégradation de la cellulose décline au cours du temps de culture et semble se répartir en trois cinétiques distinctes qui ont été attribuées à trois types d'activités cellulases. Cette modification de l'activité cellulase s'expliquerait par une augmentation de la cristallinité de la cellulose résiduelle qui devient d'autant plus difficile à hydrolyser (Giallo *et al.*, 1985).

L'ensemble de ces résultats semblait indiquer que *Clostridium cellulolyticum* ne possédait pas un potentiel de métabolisation de la cellulose particulièrement performant pour des applications industrielles. Devant l'impossibilité d'améliorer significativement la croissance de ce micro-organisme, les études se sont progressivement détournées des aspects métaboliques de la digestion de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum* (Fond *et al.*, 1983). Les études se sont alors focalisées sur l'aspect enzymatique de la dégradation de la cellulose par les cellulases et le cellulosome (Faure *et al.*, 1988 ; Madarro *et al.*, 1991 ; Petitdemange *et al.*, 1992), les applications biotechnologiques du cellulosome semblaient en effet très prometteuses (Bayer *et al.*, 1994).

Les propriétés d'adhésion et de colonisation de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum* furent aussi étudiées (Gelhay, 1993). Cette bactérie adhère de façon réversible à des sites spécifiques de la

cellulose, dans un premier temps des cellules adhèrent directement sur la cellulose puis la colonisation se poursuit avec la formation de couches superposées de cellules qui ne sont alors plus en contact direct avec le substrat (Gelhaye *et al.*, 1992 ; Gelhaye *et al.*, 1993a). Un modèle de colonisation a alors été proposé dans lequel les cellules suivent un cycle commençant par (Gelhaye *et al.*, 1993b, 1993c ; Gehin *et al.*, 1996a) (Figure 24) :

- l'adhésion d'une cellule à un site spécifique en surface de la fibre de cellulose,
- suivi de la colonisation de ce site,
- puis du relargage des cellules bactériennes dû à la saturation ou à l'hydrolyse du site initial d'adhésion,
- et enfin la réadhésion des bactéries à un nouveau site.

Lors de l'étape de relargage, correspondant vraisemblablement à une carence en substrat carboné, la sporulation des bactéries était supposée être un processus permettant la survie de *Clostridium cellulolyticum* dans sa niche écologique. Cependant les quelques études menées sur ce phénomène n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse, puisqu'une absence ou une limitation nutritionnelle en carbone ne semble pas promouvoir la formation de spores (Gehin *et al.*, 1995 ; Payot *et al.*, 1999a).

II. Les études métaboliques en chémostat

Une nouvelle étude du métabolisme de *Clostridium cellulolyticum* fut entreprise en s'appuyant sur les premières études où certaines approches expérimentales étaient critiquables puisque :

- les croissances sur cellobiose ou sur cellulose (Giallo *et al.*, 1983, 1985) ont été réalisées en cultures discontinues sans agitation continue du milieu de culture, sans régulation du pH et en flacons étanche de type "pénicilline" où les gaz issus de la fermentation s'accumulent (Lamed *et al.*, 1988).
- en culture discontinue, les propriétés physico-chimiques du milieu et donc l'environnement des bactéries varie en permanence au cours de la croissance notamment la concentration des substrats, des produits de fermentation ou encore le pH s'il n'est pas régulé (Wanner et Egli, 1990).

Ainsi, afin de faire abstraction des variations de l'environnement et d'interpréter plus en détail le métabolisme bactérien, les premières cultures continues en mode chémostat de *Clostridium cellulolyticum* ont été réalisées (Payot *et al.*, 1998). Dans ces conditions de culture,

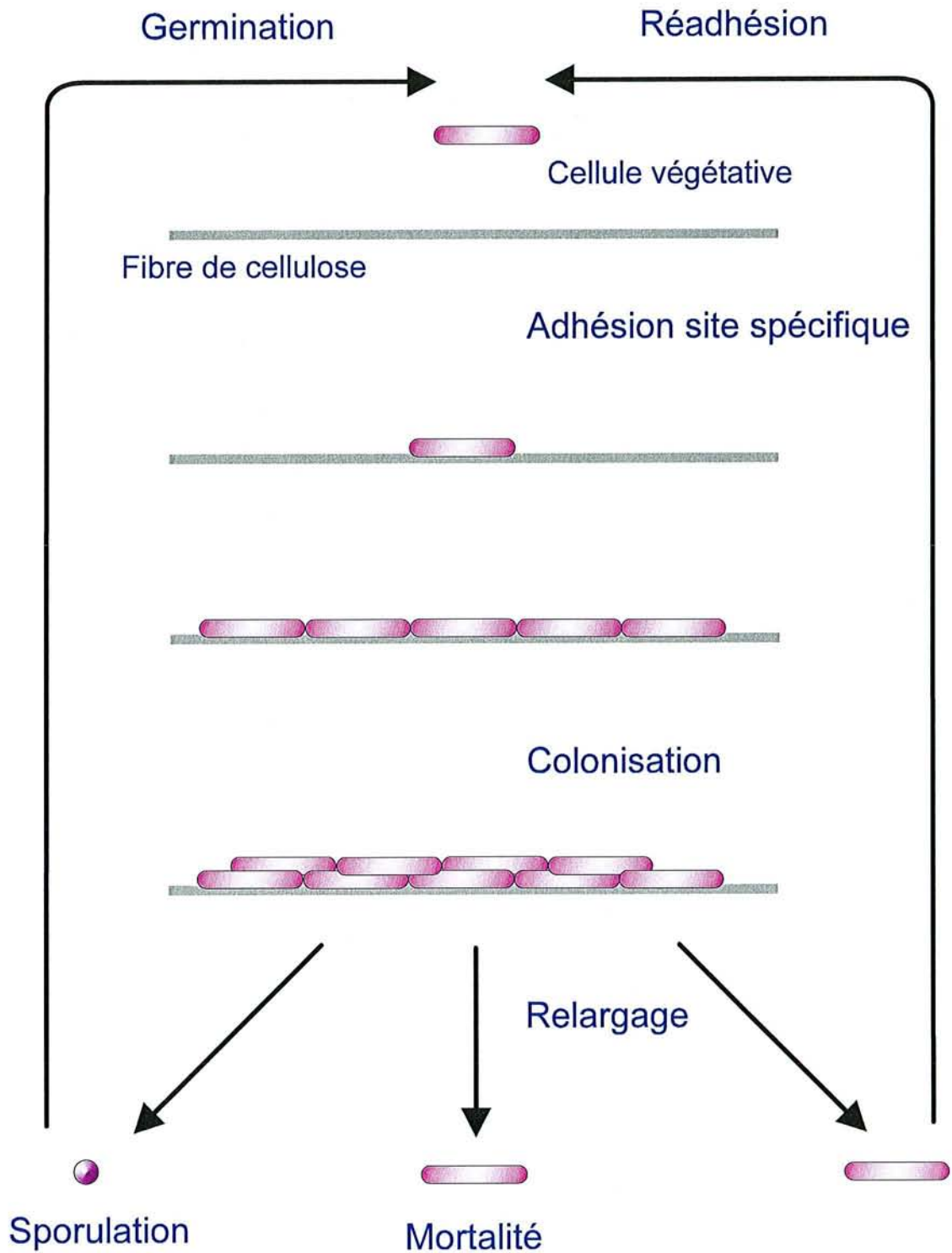


Figure 24 : Schéma du modèle de la colonisation de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum* (Adapté de Gehin *et al.*, 1996a).

l'acétate, le dioxyde de carbone, le dihydrogène, le lactate et l'éthanol sont les produits majeurs de la fermentation du cellobiose. Les produits du métabolisme étant similaires à ceux de *Clostridium thermocellum* (Ng *et al.*, 1977), un schéma général, des voies de dégradation des substrats carbonés, analogue a été proposé pour *Clostridium cellulolyticum* (Figure 22).

L'acétate est le produit majeur de la fermentation et sa vitesse de formation augmente à mesure que la vitesse de consommation du cellobiose s'élève (Payot *et al.*, 1998). Par conséquent, la production d'ATP augmente et entraîne une augmentation de la biomasse cellulaire pour des taux de dilution compris entre 0,015 h⁻¹ et 0,075 h⁻¹. Pour des taux de dilution plus élevés et malgré des valeurs de Y_{ATP} encore plus élevées, la biomasse à l'état stationnaire du réacteur chute. En effet, la voie de formation de l'éthanol qui est spécialisée dans la réoxydation des coenzymes réduits ne compense pas celle de l'acétate, ce qui implique une réorientation des électrons en direction de la NADH-Fd oxydoréductase et de l'hydrogénase (Jungermann *et al.*, 1973). Les rapports NADH/NAD⁺, aussi élevées que 57, indiquaient que cette dernière voie était limitante. Une conséquence directe de la forte teneur en NADH intracellulaire était l'inhibition de l'activité GAPDH dans le sens de l'oxydation du glycéraldéhyde 3-phosphate (Payot *et al.*, 1998, 1999b). Une augmentation du rapport NADH/NAD⁺ se traduit, *in vitro*, par une diminution de l'activité GAPDH qui devient difficilement détectable pour des valeurs de rapport supérieures à 5 (Payot *et al.*, 1998). D'autre part, les principales activités enzymatiques mesurées *in vitro* et impliquées dans le catabolisme du cellobiose telles que la GAPDH, l'activité phosphoroclastique, l'acétate kinase et l'éthanol déshydrogénase étaient relativement élevées par rapport aux faibles vitesses spécifiques des flux carbonés traversant les voies métaboliques. Ceci a permis d'écarter l'hypothèse d'un éventuel déficit enzymatique comme responsable de la faible croissance observée chez *Clostridium cellulolyticum* (Payot *et al.*, 1998).

Pour les études suivantes, un milieu de culture chimiquement défini, reprenant en partie la composition du milieu complexe mais dans lequel l'extrait de levure est remplacé par des vitamines et des sels minéraux, a été utilisé (Guedon, 2000). Le développement de ce milieu synthétique prend à contre-pied l'amélioration de la croissance de *Clostridium cellulolyticum* par enrichissement du milieu de culture (Giallo *et al.*, 1983). Il s'appuie sur le fait que les conditions nutritionnelles dans la niche écologique d'où est issue cette bactérie sont probablement oligotrophiques (Koch, 1997). Par ailleurs, il permet une analyse plus fine du métabolisme et de la bioénergétique cellulaire puisque le substrat carboné est à la fois la source de carbone et d'énergie (Guedon, 2000).

Par comparaison avec un milieu complexe, l'utilisation du milieu synthétique dans des conditions de cellobiose limitant a permis (Guedon *et al.*, 1999b) :

- d'augmenter d'environ trois fois la vitesse spécifique du flux carboné entrant.
- d'augmenter sensiblement la vitesse spécifique de croissance obtenue à l'état stationnaire du chémostat qui passe de 0,120 h⁻¹ à 0,138 h⁻¹.

- d'obtenir des rapports NADH/NAD⁺ très inférieurs à 1.

Tous ces résultats indiquaient que chez *Clostridium cellulolyticum* un meilleur contrôle du flux du carbone et des électrons se produit sur milieu synthétique. Lorsque *Clostridium cellulolyticum* est cultivé en chémostat et en cellobiose limitant, la fermentation acétate-éthanol bascule vers une fermentation lactate-éthanol aux flux carbonés entrants élevés. Un parallélisme entre les vitesses spécifiques du flux carboné entrant et la vitesse spécifique de formation du lactate a pu être mis en évidence, ces deux vitesses étant par ailleurs associées à une excrétion du pyruvate. Cette fuite de pyruvate traduit une accumulation intracellulaire de cet intermédiaire métabolique, conséquence d'une limitation du flux carboné au niveau de la PFO (Guedon *et al.*, 1999b). Ces résultats obtenus grâce à l'utilisation d'un milieu synthétique, permettent d'écarter définitivement le défaut de contrôle du flux des électrons comme cause principale de la faible biomasse et de l'inhibition de croissance de *Clostridium cellulolyticum* (Payot *et al.*, 1998, 1999b). Le déséquilibre métabolique observé précédemment avec des rapports NADH/NAD⁺ aussi élevés que 57 (Payot *et al.*, 1998), serait la conséquence des conditions expérimentales, le milieu complexe mettant la cellule dans des conditions de croissance très éloignées de celles de son écosystème naturel (Koch, 1997).

Les résultats obtenus au cours de cultures continues de *Clostridium cellulolyticum* dans des conditions de saturation de substrats sont différents de ceux obtenus en conditions de carbone limitant (Guedon *et al.*, 2000b). Alors que le flux des électrons est orienté vers l'alcool déshydrogénase aux taux de dilution élevés en cellobiose limitant, celui-ci alimente principalement la voie NADH-Fd oxydoréductase et hydrogénase en saturation de substrats. Le rapport H₂/CO₂ était augmenté tandis que la vitesse spécifique de formation de l'éthanol était stabilisée. En conséquence, le flux carboné était essentiellement orienté vers l'acétate et peu de lactate était formé. Cette diminution de la production de lactate aux taux de dilution (*D*) élevés s'accompagnait d'une absence d'excrétion du pyruvate dans le surnageant de culture (Guedon *et al.*, 2000b). Dans ces conditions, le comportement de *Clostridium cellulolyticum* contraste avec celui de la plupart des bactéries anaérobies pour lesquelles la production de lactate augmente de manière concomitante avec le taux de croissance (Russel et Hino, 1985 ; Melville *et al.*, 1988). En effet, la plupart des lactates déshydrogénases bactériennes sont régulées de manière allostérique par le fructose-1,6-diphosphate (Garvie, 1980). Ceci ne semble pas être le facteur décisif pour celle de *Clostridium cellulolyticum* puisque des concentrations intracellulaires en fructose-1,6-diphosphate constantes ou en légère augmentation ont été mesurées pour des taux de dilution croissants (Guedon *et al.*, 2000b). En revanche, il semblerait que l'absence de production de lactate par *Clostridium cellulolyticum* soit le résultat d'un détournement du flux carboné entrant vers les exopolysaccharides puisque ceux-ci représentent jusqu'à 34% du cellobiose consommé par la cellule à *D* = 0,115 h⁻¹ contre seulement 1,6% à *D* = 0,035 h⁻¹ (Guedon *et al.*, 2000b). *Clostridium cellulolyticum* présente une différence très nette en comparaison des micro-organismes cellulolytiques du rumen pour lesquels les

polysaccharides sont stockés au niveau intracellulaire jusqu'à représenter entre 30 et 60 % du poids sec (Russel, 1998) alors que *Clostridium cellulolyticum* en accumule seulement entre 3 et 5%.

Tandis que ces études en limitation et en saturation de cellobiose (Guedon *et al.*, 1999, 2000b), ont révélé la flexibilité métabolique remarquable de *Clostridium cellulolyticum*, les dernières études menées en limitation d'azote ont permis de mettre en évidence l'importance des points de branchement du glucose 1-phosphate (G1P) et du glucose 6-phosphate (G6P), dans la distribution des flux carbonés à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule (Guedon *et al.*, 2000a). Les pools de G1P et de G6P sont connectés par la phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2) ; à mesure que le flux entrant augmente, il apparaît que celui traversant la phosphoglucomutase devient une étape limitante et il en résulte une inversion du rapport G1P/G6P intracellulaire qui devient supérieur à 1 (Guedon *et al.*, 2000a). Cette accumulation du G1P intracellulaire conduit à une réorientation du métabolisme vers la production de glycogène dans un premier temps, puis sur la production d'exopolysaccharides dans un deuxième temps. L'augmentation du turn-over du polysaccharide intracellulaire associée à une taille de pool relativement modeste suggère que le glycogène est synthétisé et dégradé en permanence. Cet argument est renforcé par le fait que les activités de synthèse, ADP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27) et glycogène synthase (EC 2.4.1.21) et de dégradation, glycogène phosphorylase (EC 2.4.1.1) sont détectées à tous les taux de dilution. Ainsi, la voie du glycogène ne peut constituer qu'une voie de délestage relativement limitée pour résorber le flux en direction du G1P. Afin de contenir l'accumulation du G1P, *Clostridium cellulolyticum* met alors en place une autre voie d'évacuation du flux carboné dirigée vers la synthèse d'exopolysaccharides. Les cinétiques d'accumulation du glycogène, en cultures discontinues et continues, suggèrent que la synthèse puis la dégradation simultanée du polymère sont associées au démarrage rapide de la croissance. En mobilisant une fraction relativement faible du flux carboné puis en le redistribuant dans le métabolisme central, le cycle du glycogène constituerait une réaction d'amorçage de la glycolyse (Guedon *et al.*, 2000a). Le stockage provisoire d'intermédiaires métaboliques sous forme de glycogène permet d'éviter à la cellule de les accumuler au niveau intracellulaire à des concentrations toxiques. Une autre fonction probable du cycle du glycogène est la dissipation d'un excès d'ATP. De la même façon, la voie des exopolysaccharides permet de consommer l'excès d'énergie mais permet également d'évacuer un excès de carbone.

F. La culture continue sur cellulose

La technique de la culture continue est un outil performant pour l'étude de la physiologie des micro-organismes (Monod, 1949, 1950). Elle fournit en effet des conditions de culture stables, parfaitement définies et reproductibles. Elle permet de faire varier indépendamment certains paramètres de croissance, rendant possible des études cinétiques de la croissance et du métabolisme microbien grâce à des modèles mathématiques (Monod, 1950). Quatre types de culture continue peuvent être différenciés (Figure 25):

- Le chémostat est le type de culture continue le plus souvent rencontré. Il est défini comme une culture continue pour laquelle la vitesse d'alimentation est un facteur externe et où la croissance cellulaire est limitée par un seul nutriment (Zeng, 1999). Cette seconde condition est importante puisqu'elle signifie que la vitesse spécifique de croissance (μ), qui est égale au taux de dilution (D) à l'état stationnaire du système, est fonction d'un seul nutriment limitant. Cet état n'est atteint qu'après un certain nombre de renouvellements du bioréacteur et est vérifié lorsque à la fois la concentration de la biomasse et du nutriment limitant résiduel restent constants au cours du temps (Monod, 1950). Il s'agit bien d'un état stationnaire dans lequel une dynamique s'instaure entre les différents composants du système et non pas d'un état d'équilibre où les éléments sont figés jusqu'à la prochaine perturbation du système (Llesuy et Lissi, 1996).
- L'auxostat est une culture continue dans laquelle un paramètre dont dépend la croissance est maintenu constant en ajustant la vitesse d'alimentation, qui n'est alors plus un facteur externe comme dans le cas du chémostat. Le taux de dilution s'ajuste au taux de croissance du micro-organisme qui dépend de la valeur et du paramètre choisi. Ainsi, à l'état stationnaire $\mu = D$ comme dans un chémostat. Le paramètre de croissance choisi peut être la densité cellulaire (turbidostat), le pH (pH-auxostat), la concentration d'un nutriment (nutristat), la concentration d'un produit du métabolisme, de l'oxygène ou du gaz carbonique dissout. Il est par ailleurs possible de coupler deux paramètres simultanément pour le contrôle de la croissance (Gostomski *et al.*, 1994). Par rapport au chémostat, ce type de contrôle de la croissance permet de travailler dans des gammes de taux de dilution très proches de la vitesse spécifique maximale de croissance et l'état stationnaire du système est atteint beaucoup plus rapidement.
- La culture continue avec recyclage des cellules est un outil intéressant lorsque l'augmentation de la densité cellulaire et/ou de la production d'un métabolite est recherchée (Zeng, 1999). Les cellules étant maintenues dans le bioréacteur, des taux de dilution supérieurs à la vitesse spécifique maximale de croissance peuvent être atteints dans un tel système.

- La culture continue à étapes multiples couple plusieurs cultures continues les unes à la suite des autres (Zeng, 1999). Les systèmes à deux étapes sont les plus fréquents. Ce type de culture permet de placer dans un premier temps les cellules dans des conditions physiologiques particulières pré-requises pour la synthèse de certains métabolites comme des antibiotiques ou de certaines enzymes mais dont l'induction nécessite le passage dans d'autres conditions physiologiques.

L'utilisation de la technique de la culture continue se complique avec l'utilisation de substrats insolubles tels que la cellulose. En effet, la sédimentation de la cellulose rend difficile l'apport précis et régulier du substrat carboné insoluble dans le bioréacteur ce qui est un pré-requis indispensable à l'établissement d'un état stationnaire. Ces difficultés techniques ont eu pour conséquence un développement relativement tardif des systèmes continus utilisant des substrats insolubles. Avec la cellulose, seules des cultures continues en mode chémostat ont jusqu'à présent été réalisées.

I. Les réacteurs en continu utilisant des substrats insolubles

Le système de Lee *et al.* (1985) fut le premier décrit dans la littérature, il permet de cultiver *Clostridium acetobutylicum* en continu et en alimentant le bioréacteur avec un milieu de culture contenant du xylane. Ce système est basé sur le schéma classique d'un chémostat (Figure 25A). Dans la fiole d'alimentation le xylane est maintenu en suspension grâce à un système d'agitation par barreau magnétique. Le milieu de culture est véhiculé jusqu'au bioréacteur par des pulsations régulières de la pompe qui fonctionne à une vitesse élevée pendant 1 min à intervalles de 9 min permettant ainsi d'obtenir un taux de dilution moyen de $0,05 \text{ h}^{-1}$. De plus, en utilisant des connexions aussi courtes que possible la sédimentation du xylane à l'intérieur des connexions tend à être minimisée. Ce système a d'abord permis d'étudier l'activité xylanolytique de *Clostridium acetobutylicum* en dosant les xylanases produites dans différentes conditions de cultures (Lee *et al.*, 1985). Il fut aussi utilisé pour cultiver *Fibrobacter succinogenes* S85 sur cellulose à un taux de dilution de $0,025 \text{ h}^{-1}$ par un pompage de 40 s à intervalles de 15 min. Cette dernière étude portait sur une cellodextrinase périplasmique (Huang et Forsberg, 1987). Le type de pompage illustre la principale limitation du système de culture qui devrait plutôt être qualifié de semi-continu. Pour obtenir des taux de dilution plus faibles ni la vitesse ni le temps de fonctionnement de la pompe ne peuvent être diminués sans entraîner la sédimentation du substrat insoluble ou une trop forte discontinuité dans l'alimentation du bioréacteur qui n'est déjà pas négligeable. De même pour obtenir des taux de dilution plus élevés soit l'intervalle de temps doit être diminué soit le diamètre des connexions doit être augmenté ce qui dans tous les cas conduit à la sédimentation du substrat. Il est donc à la fois difficile de changer aisément de taux de dilution et les études sont limitées par la gamme de variation du taux de dilution relativement étroite.

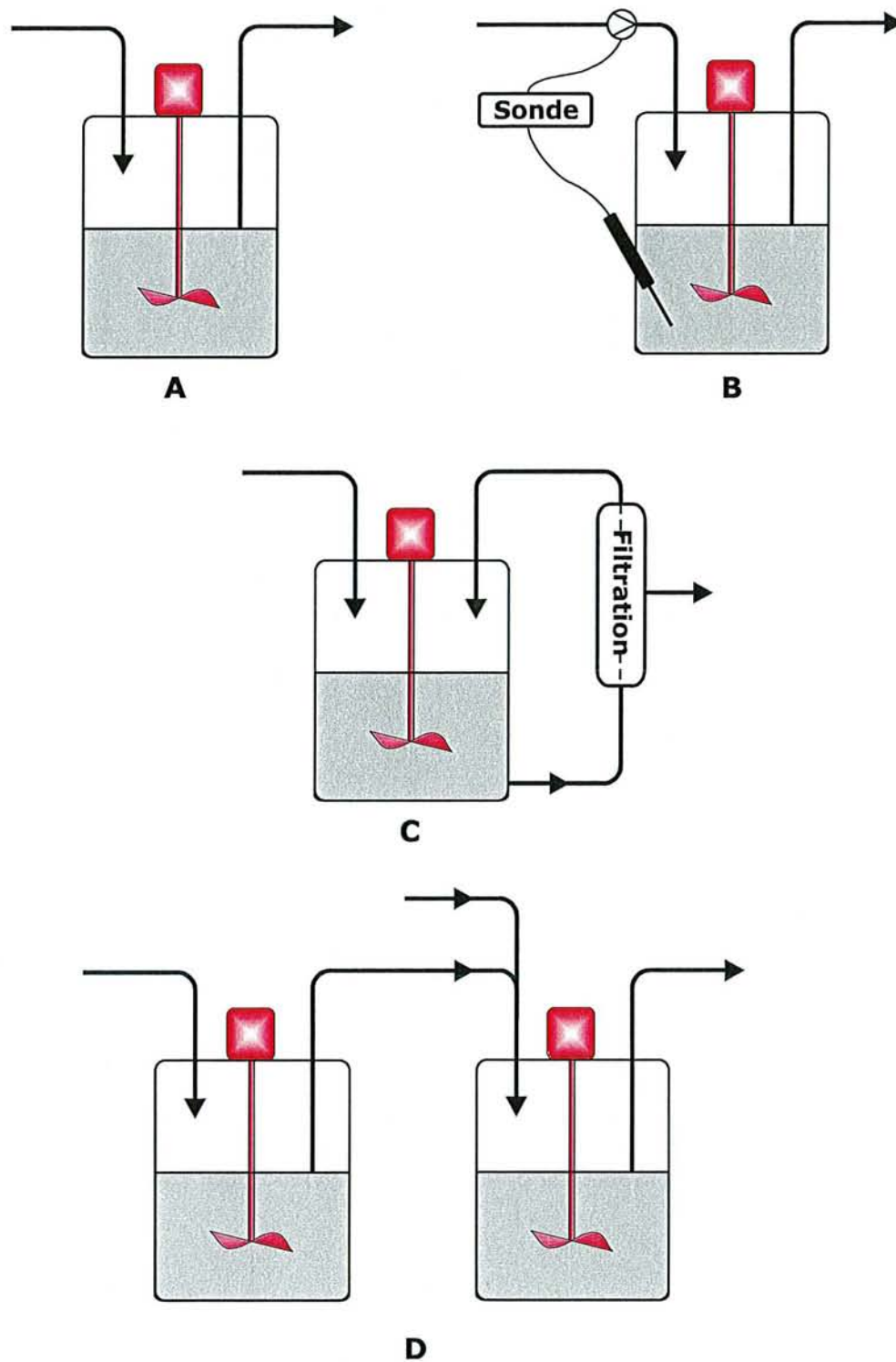


Figure 25 : Schéma des quatre types de cultures continues (Adapté de Zeng *et al.*, 1999). A : Chémostat ; B : Auxostat ; C : Culture continue avec recyclage des cellules ; D : culture continue à étapes multiples.

En 1986, un autre type de bioréacteur fut proposé par Kleijntjens *et al.* pour l'étude de la dégradation de la cellulose en continu par *Clostridium thermocellum* (Figure 26). Dans ce montage, le fermenteur est en forme de colonne. Un lit de fibres de cellulose constitue la moitié inférieure du bioréacteur tandis que la moitié supérieure ne contient que le milieu de culture sans la cellulose. Les pales du réacteur tournent suffisamment rapidement pour brasser la cellulose mais sans permettre l'homogénéisation de l'ensemble. Le milieu de culture sans la cellulose est apporté continuellement à la base du fermenteur afin de forcer son renouvellement alors que la cellulose est ajoutée indépendamment et périodiquement à mi-hauteur du réacteur. Le calcul du taux de dilution s'appuie sur le volume total de cellulose et de milieu de culture introduit dans le fermenteur en 24 h. Ce système souffre de nombreux inconvénients. L'apport de cellulose n'est pas régulier et comme précédemment, il s'agit plutôt d'une alimentation semi-continue qui rend difficile l'établissement d'un état stationnaire. Le milieu de culture n'est pas homogène ce qui rend l'interprétation des résultats difficile. Ce système reste intéressant seulement pour certaines applications industrielles puisqu'il permet de récupérer un effluent quasiment exempt de fibres de cellulose.

Le système de culture en continu utilisé par Pavlostathis *et al.* (1988a, 1988b) pour étudier la dégradation de la cellulose par *Ruminococcus albus* est le premier à permettre une alimentation réellement continue (Figure 27). La nourrice contenant le milieu de culture avec la cellulose est agitée par un barreau magnétique où une pression légèrement positive en CO₂ est maintenue. Le milieu de culture circule dans une boucle afin que la cellulose reste en suspension, la pompe péristaltique étant sous le contrôle d'un ordinateur. Une valve connectée au bioréacteur et elle aussi contrôlée par ordinateur s'ouvre périodiquement. Ceci permet une alimentation homogène et régulière dans une gamme de taux de dilution compris entre 0,02 et 0,10 h⁻¹. Cette étude est la première à fournir des données reproductibles sur la vitesse de dégradation de la cellulose par un micro-organisme. Par la suite ce système a permis d'étudier l'influence du mutualisme sur la cellulolyse et la méthanogénèse lors de cocultures de *Ruminococcus albus* et d'une *Archaea* méthanogène *Methanobrevibacter smithii* (Pavlostathis *et al.*, 1990). Ce système efficace nécessite cependant l'utilisation d'un ordinateur de contrôle.

En 1989, l'étude de la dégradation de la cellulose par *Clostridium thermocellum* initiée par Kleijntjens *et al.* (1986) fut reprise par Lynd *et al.* (1989a) en utilisant un système de culture continue plus simple que Pavlostathis *et al.* (1988a, 1988b) (Figure 28). La fiole d'alimentation, qui est sous une pression légèrement positive d'azote, est placée en hauteur juste au-dessus du bioréacteur. Le milieu de culture est simplement pompé à la base de la fiole d'alimentation par une pompe péristaltique les connexions sont courtes et verticales afin de limiter la sédimentation. Une attention particulière est portée sur l'agitation du milieu de culture contenant la cellulose dans le réservoir d'alimentation. L'homogénéisation du milieu est assurée par une agitation vive grâce à un barreau magnétique et par la présence de contre-pales. Cette étude fournit les premières données sur la vitesse de dégradation de la cellulose par *Clostridium thermocellum*. Ce même système est utilisé pour

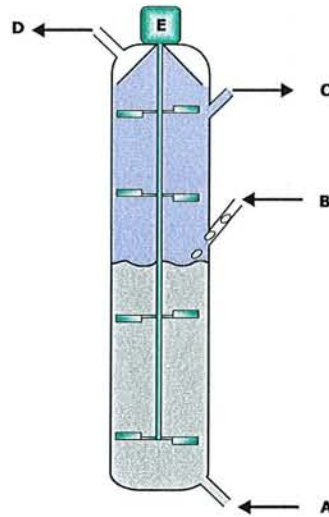


Figure 26 : Schéma d'un réacteur continu à alimentation différentielle en milieu de culture et en cellulose (Adapté de Kleijntjens *et al.*, 1986). La cellulose est en gris, le milieu de culture en bleu et les gaz sont en blanc. A : Entrée du milieu de culture ; B : Entrée de la cellulose ; C : Effluent liquide ; D : Evacuation des gaz ; E : Système d'agitation.

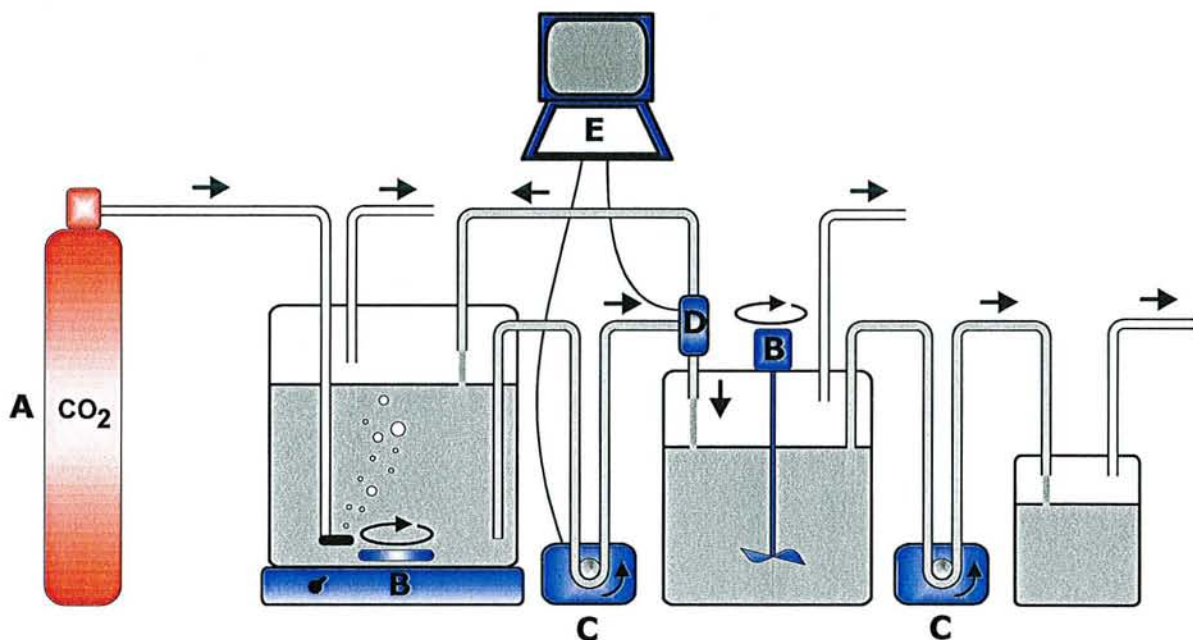


Figure 27 : Schéma du réacteur en continu développé par Pavlosthatis *et al.* (1986). Le milieu de culture est gris et les gaz sont en blanc. Les flèches indiquent la direction des flux. A : Gaz ; B : Système d'agitation ; C : Pompe péristaltique ; D : Valve électromagnétique ; E : Ordinateur de contrôle.

caractériser la capacité cellulolytique de souches de bactéries anaérobies thermophiles nouvellement isolées (Ahn et Lynd, 1996). Ce système simple ne permet pas d'écarter totalement la sédimentation de la cellulose notamment en sortie de pompe péristaltique et il ne peut atteindre des taux de dilution significativement inférieurs à $0,03 \text{ h}^{-1}$.

Le système de culture en continu de Kistner et Kornelius (1990) s'inspire de la valve du système développé par Pavlostathis *et al.* (1988a, 1988b) (Figure 29). Le ballon d'alimentation contenant la cellulose est homogénéisé par un agitateur vibratoire, il est placé juste au-dessus du bioréacteur. Le milieu n'est plus aspiré par une pompe péristaltique mais opère comme un vase de Mariotte. Une valve programmable relie directement le réservoir au réacteur et permet l'entrée du milieu de culture à intervalles réguliers, c'est la fréquence d'ouverture de la valve qui détermine le taux de dilution. Ce système fut testé avec *Ruminococcus flavefaciens* et *Fibrobacter succinogenes* et a permis d'étudier l'influence de l'acide phénylpropanoïque sur la dégradation de la cellulose par *Ruminococcus albus* (Morrison *et al.*, 1990). Ce système ne permet cependant pas de travailler à des taux de dilution inférieurs à $0,05 \text{ h}^{-1}$.

En 1991, un système plus simple et très efficace fut développé par Weimer *et al.* (1991b). Il s'agit d'un système de culture en continu à flux segmenté permettant un apport homogène et régulier de substrat. Il fut adopté pour toutes les études ultérieures nécessitant l'utilisation de substrats insolubles.

II. La culture continue à flux segmenté

Dans ce montage (Weimer *et al.*, 1991b) (Figure 30), le milieu de culture avec la cellulose contenu dans le réservoir d'alimentation est agité sous un flux de gaz humidifié (gaz carbonique, azote, argon...). La suspension, aspirée par une pompe péristaltique, passe par un système de segmentation, il s'agit simplement d'une connexion en forme de "T" par laquelle entre le milieu de culture et où du gaz est injecté par l'autre orifice à la même vitesse. Il en ressort une suspension de cellulose dans le milieu de culture divisé en segments séparés par du gaz qui est véhiculé jusqu'au bioréacteur. La cellulose est retenue dans chaque segment par la tension de surface du milieu de culture qui s'exerce à l'interface gaz/liquide.

Ce système permet un apport précis, constant et donc très reproductible de nutriments dans le bioréacteur. Ceci nécessite cependant quelques conditions opératoires rigoureuses :

- Dans la fiole d'alimentation, la combinaison des deux systèmes de mélange du milieu de culture, c'est à dire l'agitation et le bullage, sont indispensables pour maintenir une suspension homogène des particules de cellulose qui sinon formeraient des strates.

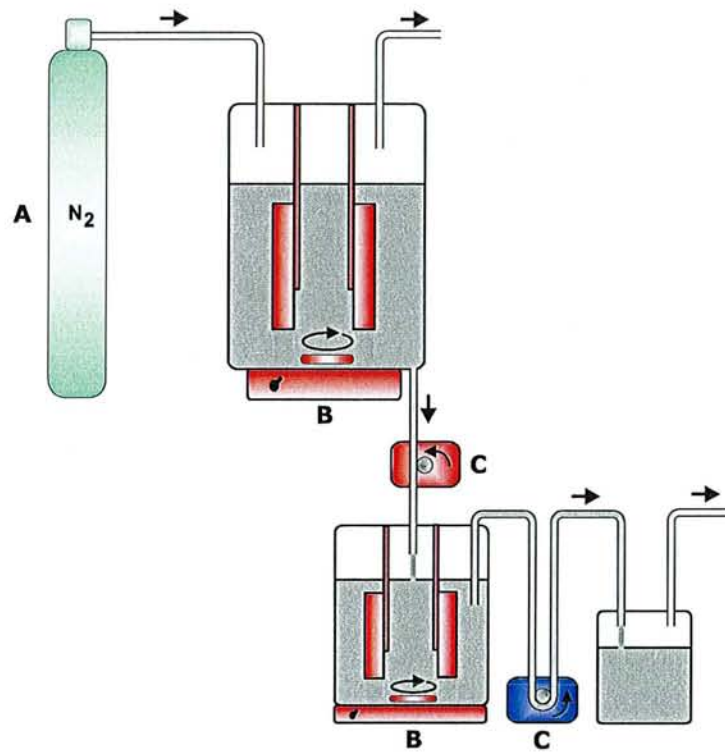


Figure 28 : Schéma du réacteur continu développé par Lynd *et al.* (1989). Le milieu de culture est gris et les gaz sont en blanc. Les flèches indiquent la direction des flux. A : Gaz ; B : Système d'agitation ; C : Pompe péristaltique.

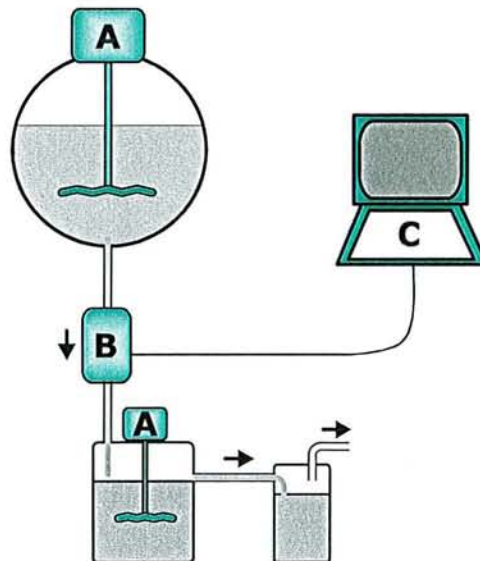


Figure 29 : Schéma d'un réacteur continu alimenté grâce à une valve (Adapté de Kistner et Kornelius, 1990). A : Système d'agitation vibratoire ; B : Valve ; C : Ordinateur de contrôle.

- Le diamètre des tuyaux de connexions doit être de l'ordre de 2,5 mm pour permettre la formation des segments.
- Les fibres de cellulose doivent être impérativement inférieures à 45 μm sinon la concentration de la cellulose varie dans le réservoir d'alimentation en se répartissant en différentes strates et la formation des segments dans les connexions devient elle aussi plus difficile.

Malgré ces quelques contraintes qui restreignent l'utilisation d'un tel système à des applications en recherche et développement, la culture continue à flux segmenté permet de fournir un flux constant et reproductible de nutriments même à des taux de dilution faibles au moins jusqu'à $0,01 \text{ h}^{-1}$ ce qui est généralement la gamme de croissance des bactéries cellulolytiques. Ce système a été utilisé pour étudier l'effet du pH et du taux de dilution sur la dégradation et la fermentation de la cellulose par *Ruminococcus flavefaciens* et *Fibrobacter succinogenes* (Shi et Weimer, 1992 ; Weimer, 1993 ; Wells *et al.*, 1995). Compte-tenu de son aspect dynamique dans des conditions environnementales stables, la culture en continu est un outil très utile pour l'étude des compétitions et des interactions qui peuvent s'établir entre différents micro-organismes. Ainsi, les interactions entre des espèces bactériennes cellulolytiques et non-cellulolytiques du rumen ont été étudiées par ce type de cultures continues à flux segmenté (Shi *et al.*, 1997 ; Chen et Weimer, 2001).

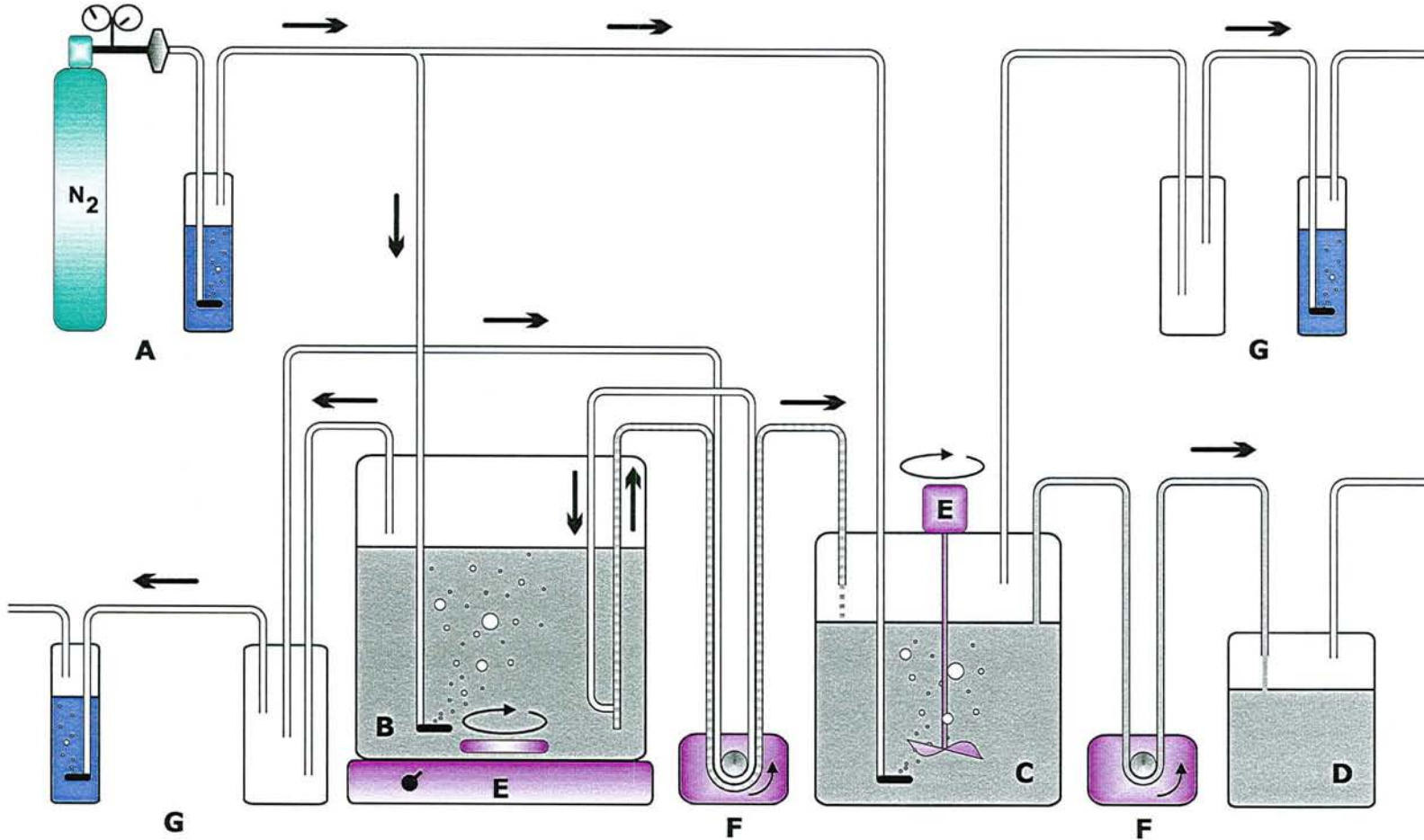


Figure 30 : Schéma d'un bioréacteur à flux segmenté alimenté en continu en cellulose. L'azote est en blanc, le milieu de culture contenant la cellulose est en gris et en bleu l'eau stérile. Les flèches indiquent l'orientation des flux. A : Système de stérilisation par filtration et d'humidification de l'azote ; B : Fiole d'alimentation contenant le milieu de culture ; C : Bioréacteur ; D : Fiole de sortie ; E : Système d'agitation ; F : Pompe péristaltique ; G : Système anti-reflux.

G. Le contexte et les objectifs de l'étude

Ce travail fut initié en 1996 dans le cadre à la fois d'un projet de la Communauté Européenne pour la recherche et le développement technologique de procédés de production de bioénergie (contrat FAIR n°95.0191) et d'un projet national avec l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) (contrat AGRICE n°97.01.041). Ce programme de recherche consistait à améliorer la biodégradation de la lignocellulose lors de la méthanisation. D'une durée initiale de 4 ans, ce projet a mis en collaboration trois partenaires :

- la société Steinmüller-Valorga, basée en France à Montpellier, qui est spécialisée dans la biodégradation anaérobie des déchets ménagers en digesteurs industriels.
- le laboratoire du Professeur Young de l'Institute of Biological Sciences of the University of Wales, basé au Royaume-Uni à Aberystwyth, qui possède une solide expérience en génétique des bactéries Gram positives en particulier chez les espèces des genres *Bacillus* et *Clostridium*.
- le Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram + du Professeur Petitdemange, qui apporte ses compétences en physiologie des bactéries anaérobies strictes.

D'un point de vue pratique, la méthanisation est une technique de conversion de la biomasse en énergie sous forme de biogaz qui est par la même occasion une voie de dépollution puisque ce processus, réalisé en absence d'oxygène, permet la dégradation de matières organiques. Pour des raisons de coût énergétique, les populations microbiennes impliquées dans ce type de bioconversion sont généralement mésophiles (Giallo *et al.*, 1983). En digesteurs industriels, cette fermentation s'accompagne de la production d'un gaz constitué d'environ 60% de méthane et de 40% de dioxyde de carbone et permet la restitution d'environ 50% de la matière organique (Guedon *et al.*, 2000c). Le biogaz peut être utilisé pour la production d'énergie sous forme de chaleur ou d'électricité ou être utilisé comme biocarburant.

Cependant la présence de composés lignocellulosiques, difficilement hydrolysables et qui sont retrouvés en quantités non négligeables en fin de fermentation, diminue le rendement de méthanisation. Ainsi, l'hydrolyse de la cellulose est fortement suspectée d'être l'étape limitante du processus biologique de minéralisation de la matière organique en méthane et gaz carbonique. Dans l'environnement, les clostridia cellulolytiques jouent un rôle majeur dans la dégradation anaérobie de la cellulose (Leschine, 1995), aussi l'idée est d'aboutir à une fermentation plus efficace des composés lignocellulosiques par l'utilisation d'une bactérie cellulolytique mésophile comme *Clostridium cellulolyticum*.

Une étude systématique du catabolisme carboné de *Clostridium cellulolyticum* a donc été entreprise afin d'identifier les régulations physiologiques de ce micro-organisme. Dans cette optique, la technique du chémostat a été largement utilisée révélant de très nettes différences entre une croissance sur un milieu complexe et sur un milieu synthétique, dans des conditions de carbone limitant, d'azote limitant ou encore de substrats saturants. Pour ces études, l'utilisation d'un glucide soluble, le cellobiose, se justifiait puisque :

- le cellobiose a longtemps été considéré comme le produit majeur de la cellulolyse (Petitdemange *et al.*, 1984).
- il s'agit de la cellodextrine la plus facilement disponible commercialement puisqu'elle possède les meilleurs rendements de synthèse (Pereira *et al.*, 1988).
- l'étude d'un métabolisme apparaît plus simple sur un substrat soluble que sur un substrat insoluble (Giallo *et al.*, 1983).

Ainsi, le cellobiose et sa métabolisation étaient considérés représentatifs de ce qui serait observé sur la cellulose. Cependant, *Clostridium cellulolyticum* étant une bactérie cellulolytique, l'étude de son métabolisme sur un substrat plus proche de la lignocellulose rencontrée dans son environnement naturel se justifie pleinement. Afin de caractériser le catabolisme de la cellulose et d'établir un modèle des flux carbonés et électroniques chez *Clostridium cellulolyticum*, des cultures discontinues et continues sur cellulose ont été réalisées. Jusqu'à présent, les seules études de la dégradation de la cellulose par cette bactérie ont été effectuées en milieu complexe, en mode discontinu, sans agitation du milieu de culture et sans régulation du pH (Giallo, 1984 ; Giallo *et al.*, 1985). Quant aux cultures continues sur cellulose, elles ont été utilisées pour caractériser la capacité d'hydrolyse de micro-organismes cellulolytiques dans différentes conditions ou pour étudier les interactions qui peuvent s'établir entre des bactéries cellulolytiques et non-cellulolytiques mais elles n'ont encore jamais été utilisées pour une étude métabolique (Weimer *et al.*, 1991 ; Shi et Weimer, 1992 ; Shi *et al.*, 1997 ; Chen *et al.*, 2001). Plusieurs points ont donc été abordés au cours de cette étude afin d'avoir une meilleure connaissance de la physiologie de ce micro-organisme sur cellulose.

Tout d'abord, afin d'éclaircir la cinétique d'apparition de l'inhibition de croissance, l'étude du métabolisme a été approfondie sur cellobiose en cultures discontinues et continues.

Puis, le catabolisme de la cellulose proprement dit a été dans un premier temps réétudié en culture discontinues en utilisant des conditions de culture plus rigoureuses que dans les premières investigations et en considérant les résultats obtenus plus récemment lors de l'utilisation d'un milieu synthétique.

En s'appuyant sur le fait que toutes les bactéries cellulolytiques anaérobies étudiées jusqu'à présent sont sensibles à l'acidification du milieu de culture (Russell et Dombrowski, 1980 ; Mourino *et*

al., 2001 ; Russell et Wilson, 1996), l'influence du pH sur le métabolisme de *Clostridium cellulolyticum* a été étudié.

Enfin, pour mieux caractériser le catabolisme et le comparer aux résultats précédemment obtenus sur cellobiose, les études ont été poursuivies en culture continue sur cellulose en conditions de carbone limitant, de substrats saturants et enfin d'azote limitant.

RESULTATS

Chapitre 2 : RÉSULTATS

A. Le catabolisme du cellobiose par *Clostridium cellulolyticum*

I. Introduction

Les premières cultures réalisées avec *Clostridium cellulolyticum* utilisaient un milieu de culture complexe contenant 5 g.l⁻¹ d'extrait de levure, malgré cela la biomasse n'excédait pas 0,6 g.l⁻¹ (Giallo *et al.*, 1983). En chémostat, l'augmentation de la vitesse du flux carboné conduisait à des rapports NADH/NAD⁺ fortement déséquilibrés pouvant atteindre un rapport aussi élevé que 57 (Payot *et al.*, 1998). Cette accumulation intracellulaire de NADH était alors associée à l'arrêt précoce de croissance observé en culture discontinue (Payot *et al.*, 1999b).

Par la suite, l'utilisation d'un milieu chimiquement défini dans lequel l'extrait de levure était remplacé par des vitamines et des sels minéraux a permis de mettre en évidence des régulations différentes du métabolisme de *Clostridium cellulolyticum* (Guedon *et al.*, 1999b). Par comparaison avec les résultats obtenus sur un milieu complexe la vitesse spécifique de consommation du substrat carboné était multipliée par trois tandis que le rapport NADH/NAD⁺ restait compris entre 0.29 et 2.08 ; tout ceci indiquait un meilleur contrôle du flux du carbone et des électrons (Guedon *et al.*, 1999b). Ces différences étaient attribuées aux conditions expérimentales et principalement au milieu de culture, en effet, un milieu de culture complexe et particulièrement riche en extrait de levure semblait contraster avec les conditions nutritionnelles de l'écosystème cellulosique naturel de *Clostridium cellulolyticum* (Koch, 1997). Mais bien que ne pouvant plus être la conséquence d'un déséquilibre du rapport NADH/NAD⁺, l'inhibition de croissance était toujours présente même en milieu synthétique.

L'augmentation du flux carboné entrant induisait un basculement d'une fermentation acétate-éthanol vers une fermentation éthanol-lactate qui coïncidait avec une excrétion de pyruvate. Ce

débordement métabolique indiquait une limitation du flux carboné au niveau des enzymes utilisant le pyruvate notamment la pyruvate-Fd oxydoréductase (PFO) (Guedon *et al.*, 1999b). Cette excrétion de pyruvate était suspectée être à l'origine de l'inhibition de croissance (Lebloas *et al.*, 1993).

Le but de cette étude est d'établir et de caractériser plus en détail l'influence du flux carboné sur l'inhibition de croissance observée chez *Clostridium cellulolyticum*. En maintenant une culture continue en conditions de carbone limitant et en augmentant progressivement la concentration de la source carbonée apportée par le réservoir d'alimentation, la concentration de la biomasse à l'état stationnaire augmente elle aussi par paliers (Russell, 1986). Le contrôle du flux carboné en mode tendu pourrait permettre de lever l'inhibition de croissance en évitant une augmentation trop brutale de la concentration en cellobiose qui entraîne alors le passage de la culture continue en conditions de carbone saturant (Guedon *et al.*, 2000b).

II. Résultats

Cette étude fut publiée dans la revue *Microbiology* dans un article intitulé : "Growth inhibition of *Clostridium cellulolyticum* by an inefficiently regulated carbon flow." 1999, 145 : 1831-1838.

Growth inhibition of *Clostridium cellulolyticum* by an inefficiently regulated carbon flow

E. Guedon, M. Desvaux, S. Payot and H. Petitdemange

Author for correspondence: H. Petitdemange. Tel: +33 3 83 91 20 53. Fax: +33 3 83 91 25 50.
e-mail: hpetitde@lcb.u-nancy.fr

Laboratoire de Biochimie
des Bactéries Gram +,
Domaine Scientifique Victor
Grignard, Université Henri
Poincaré, Faculté des
Sciences, BP 239, 54506
Vandœuvre-lès-Nancy
Cédex, France

Carbon flow in *Clostridium cellulolyticum* was investigated either in batch or continuous culture using a synthetic medium with cellobiose as the sole source of carbon and energy. Previous experiments carried out using a complex growth medium led to the conclusion that the carbon flow was stopped by intracellular NADH. In this study, results showed that cells cultured in a synthetic medium were better able to control electron flow since the NADH/NAD⁺ ratios were in the range 0.3–0.7, whereas a ratio as high as 57 was previously found in cells cultured on a complex medium. Furthermore, a specific rate of cellobiose consumption of 2.13 mmol (g cells)⁻¹ h⁻¹ was observed on synthetic medium whereas the highest value obtained on complex medium was 0.68 mmol (g cells)⁻¹ h⁻¹. When *C. cellulolyticum* was grown in continuous culture and cellobiose in the feed medium was increased from 5.84 to 17.57 mM in stepwise fashion, there was an increase in cellobiose utilization without growth inhibition. In contrast, when the reactor was fed directly with 14.62 mM cellobiose, residual cellobiose was observed (4.24 mM) and growth was limited. These data indicate that *C. cellulolyticum* is not able to optimize its growth and carbon flow in response to a sudden increase in the concentration of growth substrate cellobiose. This interpretation was confirmed (i) by the study of cellobiose batch fermentation where it was demonstrated that growth inhibition was not due to nutritional limitation or inhibition by fermentation products but was associated with carbon excess and (ii) by the growth of *C. cellulolyticum* in dialysis culture where no growth inhibition was observed due to the limitation of carbon flow by the low rate of cellobiose diffusion through the dialysis tubing.

Keywords: *Clostridium cellulolyticum*, growth inhibition, synthetic medium, carbon flow

INTRODUCTION

Clostridium cellulolyticum was previously found to undergo an early growth stoppage when grown in batch cultures on cellobiose (Giallo *et al.*, 1983). Giallo and coworkers reported that this inhibition was neither the result of nutrient depletion, nor the result of low pH or inhibition by end products; nevertheless, complex media were used routinely (Giallo *et al.*, 1983; Gelhaye *et al.*, 1993a, b; Gehin *et al.*, 1995). From a fundamental point of view and to achieve biotechnological application, it is essential to understand the conditions that direct the increase of the bacterial population since cellulolytic

clostridia are of major importance in the anaerobic digestion of lignocellulose (Leschine, 1995).

Payot *et al.* (1998) demonstrated that, on complex media, the main product of *C. cellulolyticum* cellobiose catabolism was acetate, whereas the production of reduced compounds such as ethanol or lactate was low. Such patterns of product formation were accompanied by an accumulation of intracellular NADH leading to an NADH/NAD⁺ ratio as high as 57 (Payot *et al.*, 1998). The high values of the NADH/NAD⁺ ratio inhibited glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) activity which in turn limited cellobiose catabolism and cell growth. It is difficult to understand why during the course of *C. cellulolyticum* evolution such metabolic regulations have been selected. Taking into account that

.....
Abbreviations: fd, ferredoxin; O/R, oxidation/reduction.

many natural ecosystems rarely contain all nutrients in high quantity (Koch, 1997), the aim of the present work was to study the behaviour of *C. cellulolyticum* on a synthetic medium with special attention to the effect of carbon flow on growth.

METHODS

Organism and medium. The organism used in this study was *C. cellulolyticum* ATCC 35319, originally isolated by Petitdemange *et al.* (1984) from decayed grass. Stock cultures of *C. cellulolyticum* were maintained on cellulose as described previously (Payot *et al.*, 1998) and were grown for one transfer on cellobiose before the initiation of growth experiments. The anaerobic culture technique used was that proposed by Hungate (1969) as modified by Bryant (1972).

The defined medium used in all experiments was a modification of the CM3 medium described by Weimer & Zeikus (1977) in which 5 g yeast extract l⁻¹ is replaced by oligoelement and vitamin solutions. The composition was (g l⁻¹): KH₂PO₄, 1.40; K₂HPO₄·3H₂O, 2.90; (NH₄)₂SO₄, 1.00; MgCl₂·6H₂O, 0.10; CaCl₂, 0.02; 5% (w/v) FeSO₄ in 50 mM H₂SO₄, 25 µl; trace element solution, 1.0 ml; vitamin solution, 10 ml; Na₂S, 0.50 and 0.2% (w/v) resazurin, 0.5 ml. In addition, the medium contained cellobiose in variable amounts as specified in Results. The trace element solution contained (g l⁻¹): FeSO₄·7H₂O, 5.00; ZnSO₄·7H₂O, 1.44; MnSO₄·7H₂O, 1.12; CuSO₄·5H₂O, 0.25; Na₂B₄O₇, 0.20; (Mo)₇(NH₄)₆O₂₄·4H₂O, 1.00; NiCl₂, 0.04; CoCl₂, 0.02; H₃BO₃, 0.03; Na₂SeO₃, 0.02; HCl 10 M, 50.0 ml. The composition of the vitamin solution was [mg (100 ml distilled water)⁻¹]: D-biotin, 10; *p*-aminobenzoic acid, 25; nicotinic acid, 15; riboflavin, 25; pantothenic acid, 25; thiamin, 25; cyanocobalamin, 10. The vitamin solution was sterilized by filtration with a 0.2 µm filter (Millipore).

Growth conditions. *C. cellulolyticum* was grown either in batch or in continuous culture. Cells were cultured aseptically in a 2 l bioreactor (LSL BioLafitte) with a 1.5 l working volume. Vitamin and trace element solutions, cellobiose and Na₂S were sequentially added to the medium for optimal reduction. Anoxic conditions were maintained by passing a stream of filter-sterilized nitrogen gas over the cultures. All tubing used was made of Viton (Du Pont) to prevent oxygen entry.

The temperature was maintained at 34 °C and the pH was controlled at 7.2 by automatic additions of 1 M NaOH. Agitation was kept constant at 50 r.p.m. For continuous fermentations, the volume was kept constant at 1.5 l by automatic regulation of the culture level. The inoculum was 10% by volume and was in exponential-growth phase. The culture was grown in batches for 15 h before the medium flow was started. A period of three to four residence times was found to be sufficient to achieve steady-state values of the biomass and of the residual cellobiose concentration.

In addition, dialysis cultures were grown in 3 l flasks and fermentations carried out in dialysis tubing (Visking, molecular mass cut-off 6000–8000 Da) as described previously (Gehin *et al.*, 1996). No alteration of the tubing was observed during the course of our experiments.

Analytical procedures. Bacterial growth was measured spectrophotometrically at 600 nm and calibrated against cell dry weight measurement. Samples (30 ml) were centrifuged (8000 g, 10 min, 4 °C), washed twice with 0.9% (w/v) NaCl

and dried at 65 °C to constant weight (48 h). A mean biomass formula of C₂H₇O₂N and C₁₆H₂₅O₉N₆ for extracellular proteins determined by elemental analysis (Service Central d'Analyses, CNRS), were used for elemental recovery calculations.

Culture supernatants (10000 g, 15 min, 4 °C) were stored at –80 °C until they were analysed. Cellobiose concentrations were determined by the method of Miller (1959). Acetate, lactate and ethanol were estimated by using the appropriate enzyme kits (Boehringer Mannheim). The fermenter effluent gas was measured by gas chromatography as described by Vasconcelos *et al.* (1994).

Extracellular proteins from the cell-free supernatant were measured by the Bradford dye method (Bradford, 1976). The quantity of amino acids present in the supernatant was measured using the procedure of Mokrasch (1967) and by ion-exchange chromatography on a cation-exchange resin with a Beckman 7300 amino acid analyser. The mean elemental amino acid composition was C₃H₁₀O_{2.5}N.

Extracellular pyruvate was quantitatively assayed using an enzymic method coupled with fluorimetric detection of NADH. Emission was measured at 459 nm after excitation at 341 nm with a fluorimeter (Hitachi F2000). The mixture contained triethanolamine buffer (0.1 M, pH 7.6), NADH (12.5 µM) and lactate dehydrogenase (10 U).

Enzymic determination of intracellular pyruvate was not possible due to significant interference by extracellular pyruvate which led to erroneous estimates of intracellular concentrations.

Levels of NAD(P)⁺ and NAD(P)H in the biomass were measured by first extracting the nucleotides from a sample of culture. NAD(P)⁺ and NAD(P)H were extracted with HCl and KOH, respectively, as described by Wimpenny & Firth (1972). Levels of coenzymes in both extracts were determined by fluorimetric measurements. NAD⁺ was assayed with a NAD(H)-specific alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) and NADP⁺ was assayed with a glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) (Klingenberg, 1965; London & Knight, 1966). NADH was determined using a lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) assay (Klingenberg, 1965). NADPH was measured in a reaction mixture containing 100 mM triethanolamine buffer (pH 6.0), 20 mM α-ketoglutaric acid and 20 U of NADP(H)-specific glutamate dehydrogenase from *Proteus* species (EC 1.4.1.4).

Calculations. The main products of cellobiose fermentation by *C. cellulolyticum* are acetate, ethanol, lactate, H₂ and CO₂ (Giallo *et al.*, 1983). The reactions leading to the formation of the metabolites were described previously (Payot *et al.*, 1998).

$q_{\text{cellobiose}}$ is the specific rate of cellobiose used in mmol (g cells)⁻¹ h⁻¹; q_{acetate} , q_{ethanol} and q_{lactate} are the specific rates of product formation in mmol (g cells)⁻¹ h⁻¹; and extracellular q_{pyruvate} is the specific rate of extracellular pyruvate formation in µmol (g cells)⁻¹ h⁻¹.

The specific rates of NADH production and NADH consumption were calculated as described previously (Payot *et al.*, 1998).

The specific rate of H₂ production via the NADH-ferredoxin (fd)-H₂ path was calculated as follows:

$$q_{\text{NADH-fd}} = q_{\text{NADH produced}} - q_{\text{NADH used}}$$

The oxidation/reduction (O/R) index was calculated according to Gottschalk (1985).

Y_{ATP} , the energetic yield of biomass, can be calculated from acetate, lactate and ethanol concentrations according to equations described previously (Payot *et al.*, 1998).

$$Y_{ATP} = \text{biomass concn} / (2\text{concn}_{\text{acetate}} + \text{concn}_{\text{lactate}} + \text{concn}_{\text{ethanol}})$$

Y_{ATP} is in g cells (mol ATP)⁻¹ produced.

$Y_{X/S}$, the molar growth yield for cellobiose, is in g cells (mol cellobiose)⁻¹ used.

Carbon recoveries were calculated from the production of biomass, fermentation products, amino acids and extracellular proteins present in the supernatant.

RESULTS

Kinetic analysis of batch cellobiose fermentation

When *C. cellulolyticum* was grown in batch culture on a defined medium with 23.4 mM cellobiose as an energy source, the growth curve (Fig. 1a) was characterized by a maximum specific growth rate of 0.18 h⁻¹ (Fig. 2a). During the first 10 h after inoculation, growth and cellobiose consumption rates accelerated (Fig. 2a) and the cells produced acetate, ethanol and pyruvate (Fig. 1b). Accelerating growth was correlated with increasing

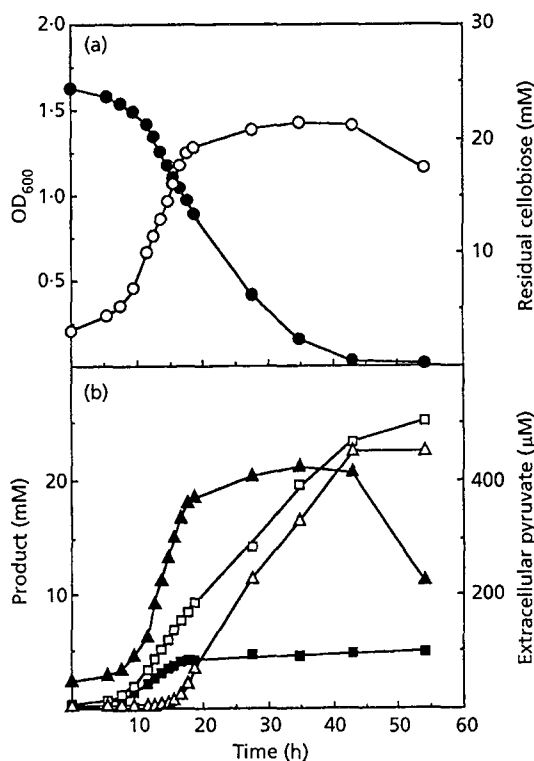


Fig. 1. Growth and cellobiose concentration (a) and product concentrations (b) during batch fermentation of *C. cellulolyticum*. The cellobiose concentration was 23.4 mM; ammonium concentration (26.5 mM) was always in excess. ○, Biomass; ●, cellobiose; □, acetate; △, lactate; ■, ethanol; ▲, extracellular pyruvate.

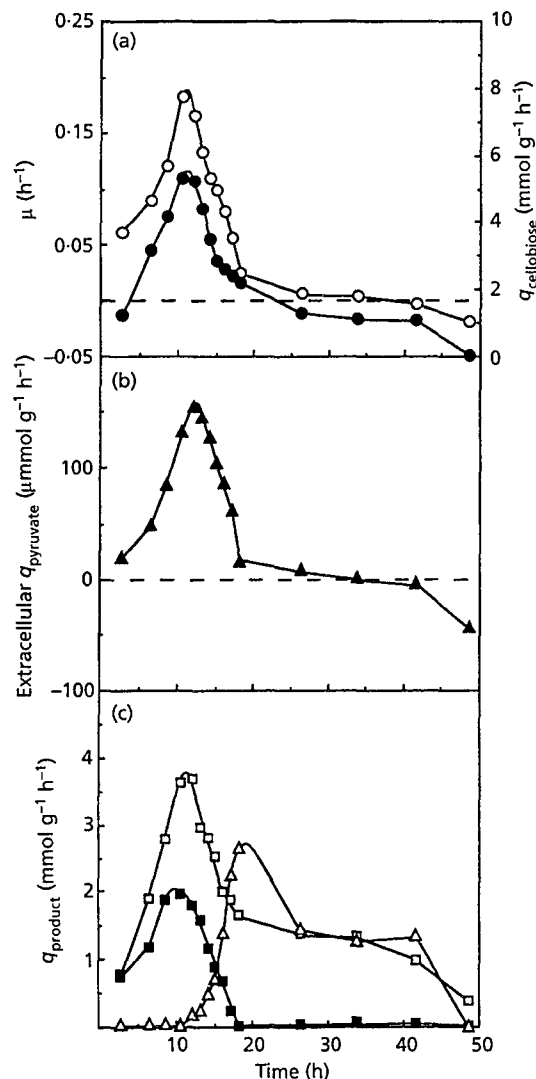


Fig. 2. Specific rates of growth and cellobiose consumption (a) and product formation (b, c) during batch fermentation of *C. cellulolyticum*. The cellobiose concentration was 23.4 mM; ammonium concentration was always in excess. ○, Specific growth rate; ●, specific rate of cellobiose consumption; ▲, □, △, ■, specific rates of extracellular pyruvate, acetate, lactate and ethanol formation, respectively.

production of extracellular pyruvate (Fig. 2b), acetate and ethanol (Fig. 2c) and was followed abruptly by a decelerating growth phase (Fig. 2a). The start of lactate formation (Fig. 2c) was associated with the peak of extracellular pyruvate production and the increase in the specific rate of lactate production corresponded to the decrease in pyruvate, acetate and ethanol biosynthesis (Fig. 2b, c). Between 25 and 43 h, the q_{lactate} was stable and coincided with an almost nil pyruvate production (Fig. 2b, c). Growth ceased before the cellobiose was depleted (Fig. 1a), but cells continued to catabolize cellobiose and produce acetate and lactate.

Table 1. Substrate, biomass and product concentrations and yields for continuous cultures of *C. cellulolyticum*

During all experiments, ammonium concentration was always in excess. For experiments A–H₁, cultures were provided with cellobiose in increasing amounts from 5.84 to 20.46 mM (see Fig. 3 legend). In the experiments S, the reactor was fed directly with 14.62 mM cellobiose. Values represent mean determinations from three different samples (\pm SD). All other values were determined with a mean accuracy of 10%.

| Experiments | D (h ⁻¹) | Feed cellobiose (mM) | Residual cellobiose (mM) | Biomass (g l ⁻¹) | Product yield (mol (mol cellobiose) ⁻¹) | | | Extracellular pyruvate (μM) | Extracellular protein (mg l ⁻¹) | Amino acids (mM) | Carbon recovery (%) |
|------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|------------------------------|---|---------|---------|-----------------------------|---|------------------|---------------------|
| | | | | | Acetate | Lactate | Ethanol | | | | |
| A | 0.086 | 5.84 | 0.12 ± 0.05 | 0.332 ± 0.015 | 1.68 | 0.10 | 0.53 | 149.2 ± 8.2 | 28.9 ± 1.1 | 0.56 ± 0.04 | 84.3 |
| B | 0.083 | 7.31 | 0.23 ± 0.08 | 0.388 ± 0.016 | 1.61 | 0.09 | 0.54 | 172.9 ± 9.3 | 44.8 ± 2.5 | 0.69 ± 0.04 | 79.5 |
| C | 0.085 | 8.77 | 0.17 ± 0.07 | 0.475 ± 0.020 | 1.69 | 0.09 | 0.53 | 208.5 ± 9.9 | 57.2 ± 2.7 | 0.81 ± 0.05 | 83.4 |
| D | 0.083 | 10.23 | 0.12 ± 0.06 | 0.581 ± 0.024 | 1.78 | 0.11 | 0.56 | 267.4 ± 12.8 | 62.5 ± 2.8 | 0.83 ± 0.05 | 86.8 |
| E | 0.086 | 12.42 | 0.21 ± 0.07 | 0.724 ± 0.031 | 1.73 | 0.14 | 0.54 | 327.5 ± 14.7 | 84.0 ± 4.0 | 0.98 ± 0.06 | 85.9 |
| F | 0.084 | 14.62 | 0.26 ± 0.07 | 0.789 ± 0.030 | 1.60 | 0.19 | 0.56 | 372.9 ± 15.5 | 96.2 ± 4.1 | 1.27 ± 0.07 | 83.8 |
| G | 0.084 | 17.57 | 0.21 ± 0.08 | 0.863 ± 0.035 | 1.54 | 0.23 | 0.59 | 414.6 ± 18.2 | 132.9 ± 5.7 | 1.68 ± 1.01 | 81.4 |
| H ₁ * | 0.085 | 20.46 | 0.88 ± 0.12 | 0.860 ± 0.032 | 1.25 | 0.46 | 0.75 | 443.1 ± 18.9 | 142.6 ± 5.6 | 1.25 ± 0.08 | 82.0 |
| H ₂ * | 0.085 | 20.46 | 1.69 ± 0.14 | 0.741 ± 0.029 | 1.34 | 0.42 | 0.89 | 411.6 ± 17.6 | 166.6 ± 6.1 | 1.15 ± 0.06 | 85.5 |
| H ₃ * | 0.085 | 20.46 | 2.77 ± 0.18 | 0.621 ± 0.028 | 1.27 | 0.34 | 0.93 | 395.7 ± 16.4 | 167.4 ± 6.3 | 0.85 ± 0.05 | 80.0 |
| H ₄ | 0.085 | 20.46 | 2.04 ± 0.15 | 0.733 ± 0.032 | 1.22 | 0.34 | 0.97 | 386.4 ± 16.3 | 177.1 ± 6.8 | 0.94 ± 0.06 | 80.6 |
| S | 0.083 | 14.62 | 4.24 ± 0.24 | 0.487 ± 0.200 | 1.22 | 0.37 | 0.83 | 267.8 ± 12.3 | 115.9 ± 5.1 | 1.11 ± 0.06 | 83.8 |

* Values of parameters are shown but were not obtained under steady-state conditions.

When the cellobiose was exhausted, cell lysis was observed despite a slight consumption of pyruvate. The stationary phase occurred before cellobiose became limiting and the growth arrest could not be attributed to limitation or inhibition by fermentation products since the same culture reinoculated allowed growth of the new inoculum (data not shown). This result indicates that growth inhibition of *C. cellulolyticum* was not due to the appearance of inhibitory compounds in the culture medium. This was confirmed by the growth of *C. cellulolyticum* in a supernatant from a culture entering stationary phase which was centrifuged and filtered or autoclaved (data not shown).

Growth of *C. cellulolyticum* with increasing amounts of cellobiose

When *C. cellulolyticum* was grown in continuous culture at a specific growth rate (μ) of approximately 0.085 h⁻¹ and the concentration of cellobiose in the feed medium was increased in stepwise fashion, there was an increase in cellobiose consumption (Table 1) without growth inhibition (Fig. 3). Cultures which were provided with cellobiose progressively from 5.84 to 17.57 mM (experiments A–G, Table 1) utilized almost all the carbon source (< 0.26 mM left) and the microbial population increased regularly whilst the values of Y_{ATP} were almost constant (Table 2). Nevertheless, when the feed cellobiose concentration was 17.57 mM, the growth parameters Y_{ATP} and Y_{X/S} decreased, i.e. from 13.9 to 12.7 g cells (mol ATP)⁻¹ and from 54.9 to 49.7 g cells (mol cellobiose)⁻¹ for experiments F and G, respectively, indicating that some cellobiose and hence ATP were not associated with biomass formation. The same effects were accentuated when the cellobiose concentration was increased to 20.46 mM (experiments H₁–H₄). The residual cellobiose concentration increased from 0.88 to 2.77 mM and the biomass decreased from 0.860 to

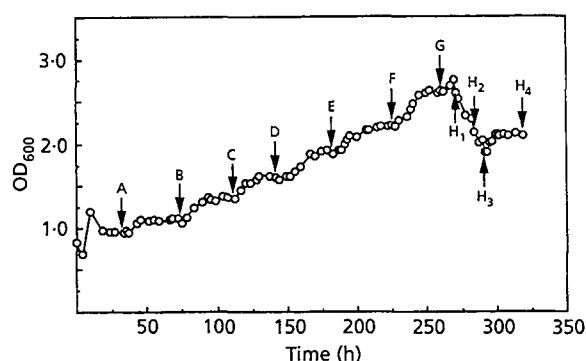


Fig. 3. Growth of *C. cellulolyticum* in continuous culture ($D = 0.085 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$) with increasing amounts of cellobiose from 5.84 mM (experiment A) to 20.46 mM (experiment H). The culture was sampled at the times indicated by arrows, before the addition of cellobiose concentration. Feed cellobiose (mM): A, 5.84; B, 7.31; C, 8.77; D, 10.23; E, 12.42; F, 14.62; G, 17.57; H₁–H₂–H₃–H₄, 20.46. Data from these experiments are summarized in Tables 1, 2 and 3.

0.621 g l⁻¹ (steps H₁, H₂, H₃); the steady state was recovered only in step H₄, and Y_{X/S} (39.8 g cells mol⁻¹) and Y_{ATP} (10.7 g cells mol⁻¹) decreased sharply. These results indicate that (i) experiments A–G were performed under conditions of cellobiose limitation, (ii) increased carbon flow from 1.46 to 1.69 mmol cellobiose (g cells)⁻¹ h⁻¹ was balanced by the demands for biosynthesis, (iii) the increase of q_{cellobiose} above 1.69 mmol (g cells)⁻¹ h⁻¹ led to substrate-sufficient cultures with imbalance between cellobiose uptake and the demands for biosynthesis.

When the reactor was fed directly with 14.62 mM cellobiose in experiment S, compared with experiment G (17.57 mM cellobiose), the residual cellobiose con-

Table 2. Specific consumption and production rates for the continuous cultures of Table 1

For experiments A–H₁, cultures were provided with cellobiose in increasing amounts from 5.84 to 20.46 mM (see Fig. 3 legend). In the experiments S, the reactor was fed directly with 14.62 mM cellobiose. Values represent mean determinations from three different samples (\pm SD). All other values were determined with a mean accuracy of 10%.

| Experiments | D (h ⁻¹) | Specific rate of cellobiose consumption or product formation (mmol (g cells) ⁻¹ h ⁻¹) | | | | Extracellular q_{pyruvate} ($\mu\text{mol (g cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$) | Y_{ATP} [(g cells) mol ⁻¹] | Y_{XS} [(g cells) mol ⁻¹] |
|------------------|----------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|--|---|--|
| | | $q_{\text{cellobiose}}$ | q_{acetate} | q_{lactate} | q_{ethanol} | | | |
| A | 0.086 | 1.46 | 2.49 | 0.14 | 0.78 | 38.6 | 14.5 | 58.0 |
| B | 0.083 | 1.51 | 2.44 | 0.13 | 0.82 | 37.0 | 14.2 | 54.8 |
| C | 0.085 | 1.54 | 2.61 | 0.14 | 0.82 | 37.3 | 13.7 | 55.2 |
| D | 0.083 | 1.44 | 2.57 | 0.15 | 0.81 | 38.2 | 13.6 | 57.5 |
| E | 0.086 | 1.45 | 2.51 | 0.21 | 0.79 | 38.9 | 14.3 | 59.3 |
| F | 0.084 | 1.53 | 2.45 | 0.26 | 0.86 | 39.7 | 13.9 | 54.9 |
| G | 0.084 | 1.69 | 2.60 | 0.35 | 1.00 | 40.3 | 12.7 | 49.7 |
| H ₁ * | 0.085 | 1.94 | 2.41 | 0.90 | 1.45 | 43.6 | 11.8 | 43.9 |
| H ₂ * | 0.085 | 2.15 | 2.88 | 0.91 | 1.91 | 47.2 | 10.1 | 39.5 |
| H ₃ * | 0.085 | 2.42 | 3.09 | 0.83 | 2.24 | 54.1 | 8.9 | 35.1 |
| H ₄ | 0.085 | 2.13 | 2.62 | 0.73 | 1.99 | 44.8 | 10.7 | 39.8 |
| S | 0.083 | 1.77 | 2.15 | 0.65 | 1.46 | 45.6 | 12.9 | 46.9 |

* Values of parameters are shown but were not obtained under steady-state conditions.

Table 3. Oxidoreduction balance, nucleotide levels and electron flow for the continuous cultures of Table 1

For experiments A–H₁, cultures were provided with cellobiose in increasing amounts from 5.84 to 20.46 mM (see Fig. 3 legend). In the experiments S, the reactor was fed directly with 14.62 mM cellobiose. Values represent mean determinations from three different samples (\pm SD). All other values were determined with a mean accuracy of 10%.

| Experiments | D (h ⁻¹) | H ₂ [mol (mol cellobiose) ⁻¹] | CO ₂ [mol (mol cellobiose) ⁻¹] | H ₂ /CO ₂ | O/R index | Intracellular nucleotide [$\mu\text{mol (g cells)}^{-1}$] | | | | q_{hydrogen} [mmol (g cells) ⁻¹ h ⁻¹] | $q_{\text{NADH produced}}/q_{\text{NADH used}}$ |
|------------------|----------------------|--|---|---------------------------------|-----------|---|---------------|------------------|-------------------|---|---|
| | | | | | | NADH | NADPH | NAD ⁺ | NADP ⁺ | | |
| A | 0.086 | 3.54 | 2.34 | 1.51 | 1.02 | 5.3 \pm 0.9 | 3.2 \pm 0.5 | 17.1 \pm 3.7 | ND | 1.70 | 1.99 |
| B | 0.083 | 3.04 | 2.00 | 1.52 | 0.97 | 5.9 \pm 0.8 | 3.8 \pm 0.4 | 16.3 \pm 3.5 | ND | 1.62 | 1.91 |
| C | 0.085 | 3.54 | 2.30 | 1.54 | 1.00 | 6.4 \pm 1.2 | 3.6 \pm 0.5 | 17.3 \pm 3.6 | ND | 1.79 | 2.01 |
| D | 0.083 | 3.72 | 2.43 | 1.53 | 1.00 | 7.0 \pm 1.2 | 3.6 \pm 0.4 | 17.2 \pm 3.4 | 0.06 \pm 0.01 | 1.77 | 2.00 |
| E | 0.086 | 3.41 | 2.20 | 1.55 | 0.98 | 6.2 \pm 1.1 | 3.4 \pm 0.4 | 15.5 \pm 3.2 | 0.06 \pm 0.01 | 1.72 | 1.96 |
| F | 0.084 | 3.43 | 2.23 | 1.54 | 0.98 | 6.9 \pm 1.5 | 3.8 \pm 0.5 | 17.7 \pm 3.5 | 0.04 \pm 0.01 | 1.59 | 1.81 |
| G | 0.084 | 3.14 | 2.08 | 1.51 | 0.96 | 6.9 \pm 1.3 | 3.7 \pm 0.4 | 16.1 \pm 3.1 | 0.06 \pm 0.01 | 1.59 | 1.68 |
| H ₁ * | 0.085 | 2.86 | 2.06 | 1.39 | 0.94 | 7.3 \pm 1.8 | 3.3 \pm 0.4 | 13.6 \pm 2.9 | 0.08 \pm 0.01 | 0.96 | 1.25 |
| H ₂ * | 0.085 | 2.90 | 2.28 | 1.27 | 0.98 | 8.8 \pm 1.7 | 3.5 \pm 0.5 | 12.5 \pm 2.6 | 0.06 \pm 0.01 | 0.96 | 1.21 |
| H ₃ * | 0.085 | 2.52 | 2.14 | 1.18 | 0.98 | 8.9 \pm 1.9 | 3.3 \pm 0.4 | 16.3 \pm 3.2 | 0.07 \pm 0.01 | 0.85 | 1.16 |
| H ₄ | 0.085 | 2.33 | 2.09 | 1.11 | 1.00 | 7.3 \pm 1.7 | 3.6 \pm 0.5 | 12.2 \pm 2.6 | 0.06 \pm 0.01 | 0.63 | 1.13 |
| S | 0.083 | 2.43 | 1.98 | 1.23 | 0.97 | 7.2 \pm 1.2 | 3.4 \pm 0.5 | 10.6 \pm 2.9 | ND | 0.69 | 1.19 |

ND, Not detectable.

* Values of parameters are shown but were not obtained under steady-state conditions.

centration increased and the biomass decreased (38.3%). This comparison indicated that the cells were not able to regulate high carbon flow and that the growth inhibition observed in experiment S was not due to end-product toxicity since end-product concentrations were higher in experiment F (Table 1). *C. cellulolyticum* may have been unable to regulate the cellobiose uptake and growth inhibition may have been due to an inability of bacteria to deal with high concentrations of carbon compounds internally.

Extracellular pyruvate was observed in all experiments (Table 1), suggesting that the flow through the pyruvate:fd oxidoreductase was limiting. An increase in pyruvate concentration correlated with accumulation of extracellular protein and biomass. The global carbon

balance, calculated by taking into account cellobiose consumption converted into biomass, products, amino acids and peptides, was in the range 79.5–86.8% (Table 1). The specific rates of acetate, lactate, pyruvate and ethanol formation were almost stable during experiments A–G (Table 2), except that q_{lactate} and q_{ethanol} increased in experiments E–G and F–G, respectively. Their specific production rate increased sharply when cellobiose was present in excess (experiments H₄ and S), whereas q_{acetate} and q_{pyruvate} remained nearly constant.

Redox balance

For the chemostats carried out under carbon limitation, the coenzyme balance (Table 3) calculated from the known catabolic pathways producing or consuming

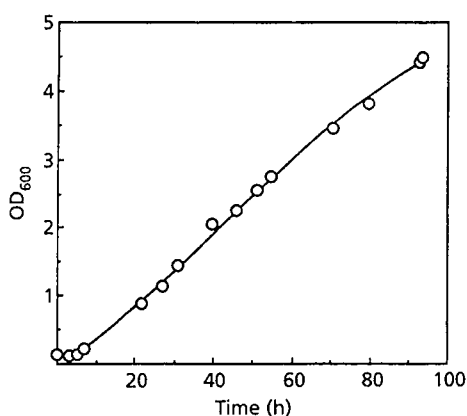


Fig. 4. Growth of *C. cellulolyticum* in dialysis tubing.

reducing equivalents demonstrate an excess of NADH since the ratio $q_{\text{NADH produced}}/q_{\text{NADH used}}$ was always greater than 1 (experiments A–G, Table 3). This result correlated with ratios of H_2/CO_2 greater than 1 obtained by measuring CO_2 and H_2 evolved. These ratios suggest that H_2 was produced via NADH:fd reductase and hydrogenase activities in addition to the phosphoroclastic reaction, which produces 1 mol CO_2 and 1 mol H_2 (mol pyruvate)⁻¹ catabolized (Mortenson *et al.*, 1963). When chemostat cultures were incubated with excess cellobiose, the main effect was an increase in the specific rates of lactate and ethanol production: the q_{lactate} and q_{ethanol} increased by a factor of 2 and the H_2/CO_2 ratios decreased from 1.5 to 1.1–1.2 (experiments H₄ and S).

The low values of q_{lactate} and q_{ethanol} under conditions of cellobiose limitation (experiments A–G) apparently were not sufficient to regenerate the NAD^+ from NADH, so the production of H_2 via NADH:fd- H_2 with $q_{\text{NADH:fd}}$ from 1.59 to 1.79 mmol (g cells)⁻¹ h⁻¹ (Table 3) was more significant in these culture conditions than under cellobiose excess (experiments H₁–H₄ and S).

Taking into account the production of hydrogen gas, ethanol and lactate, the O/R index was determined to be around 1. The nucleotide levels did not vary significantly among cellobiose-sufficient or excess cultures, NADP^+ was not or almost not detectable, whereas the NADPH levels were remarkably constant (Table 3). NADH ranged from 5.3 to 7.3 μmol (g cells)⁻¹ and NAD^+ from 10.6 to 17.7 μmol (g cells)⁻¹, indicating an efficient regeneration of NAD^+ from NADH.

Dialysis culture

C. cellulolyticum was grown in dialysis culture on mineral medium with 23.4 mM cellobiose as described by Gehin *et al.* (1996) (Fig. 4). A linear growth curve was observed with a maximum generation time of 4 h, which correlated with the value found in batch culture (3.8 h). It is likely that cellobiose diffusion limited growth since

this compound was not detected inside the dialysis tubing. This may have led to a decrease in the carbon flow, and enabled an increase of the biomass formation by a factor of 3 to occur.

DISCUSSION

Previous work indicated that growth of *C. cellulolyticum* in chemostat cultures on complex medium was limited by an imbalance in the specific rate of NADH production and the specific rate of NADH consumption, leading to NADH/ NAD^+ ratios as high as 57 and intracellular NADH concentrations ranging from 3 to 40 μmol (g cell mass)⁻¹ (Payot *et al.*, 1998). It was concluded that high intracellular concentrations of NADH detected in complex medium revealed a low rate of NADH reoxidation (Holms, 1996) and that the production of lactate, ethanol and hydrogen via NADH:fd- H_2 was rate limiting. Due to a low rate of NADH reoxidation, the cells probably maintain a sufficient NAD^+ pool size available for cellobiose catabolism.

This study shows that changing the growth condition from complex medium to synthetic medium had a strong effect on the electron flow since the NADH produced by glycolysis was well balanced by the production of hydrogen gas, ethanol and lactate, leading to NADH/ NAD^+ ratios in the range of 0.3–0.7. This interpretation was supported by the results of our study on the effect of carbon flow in *C. cellulolyticum* grown in chemostat culture on synthetic medium. At low *D* values high H_2/CO_2 and NADH/ NAD^+ ratios were observed, coinciding with low q_{lactate} and q_{ethanol} values and low *in vitro* lactate and ethanol dehydrogenase activities. In contrast, at high *D* values the H_2/CO_2 and NADH/ NAD^+ ratios decreased sharply, whereas the q_{lactate} and q_{ethanol} values and *in vitro* lactate and ethanol dehydrogenase activities increased (data not shown).

Compared with growth on complex medium, the specific production rates of ethanol and lactate were both increased about 10-fold during growth on synthetic medium. Clearly, these data indicate a better control of the electron flow by *C. cellulolyticum*, i.e. low NADH/ NAD^+ ratios with lactate and ethanol production complementing hydrogen via NADH:fd- H_2 .

In addition to a better regulation of the redox balance in cells grown in synthetic medium explaining higher specific cellobiose consumption in this medium, it is necessary to take into consideration the fact that, on complex medium, yeast extract supplies many cell constituents and cellobiose serves mainly as an energy supply, whereas on mineral salts medium, a mean value of 60% of the cellobiose consumed was converted into end products of fermentation and the rest into biomass and extracellular proteins and amino acids.

Nevertheless, the rate of cellobiose catabolism apparently exceeded the rate of pyruvate consumption, since pyruvate accumulated. This suggests that, in *C. cellulolyticum*, pyruvate consumption via pyruvate fd-oxido-

reductase is a rate-limiting step. When carbon flow was limited either by cellobiose diffusion through the dialysis tubing or by continuous culture under cellobiose limitation, no growth inhibition was observed. It may thus be concluded that growth inhibition was directly related to an inefficiently regulated carbon flow. This interpretation was supported by the results of studies of growth in cellobiose batch cultures, in which growth arrest was not due to nutritional limitation or inhibition by fermentation products since new cells reinoculated in the same culture were able to grow. The growth arrest of the first seeding could be explained by a carbon flow which leads to an accumulation of intracellular inhibitory compounds. Due to early inhibition of metabolism, the accelerating growth phase was rapidly followed by the decelerating growth phase and a μ_{\max} of 0.18 h^{-1} could not be maintained (Fig. 2). In view of these considerations, it can be argued that *C. cellulolyticum* is not adapted to use carbon source and other nutrients in excess since, on complex medium, cells were not able to induce high specific rates of ethanol and lactate production. Indeed, natural ecosystems where cellulolytic microbes proliferate rarely contain all nutrients in saturating quantities, particularly a carbon source derived from cellulose. This insoluble substrate is usually coated by other polymers, predominantly xylan and lignin, which may hinder cellulolysis and hence reduce carbon availability.

It has been found that many bacteria isolated from oligotrophic reservoirs acquire the ability spontaneously or by adaptation to develop on rich media (Kuznetsov *et al.*, 1979). However, this is not the case with *C. cellulolyticum* or with cellulolytic bacteria as a rule (Sleat *et al.*, 1984; Cailliez *et al.*, 1992; Tomme *et al.*, 1995). It is reasonable to suppose that during the course of *C. cellulolyticum* evolution, these bacteria have evolved to optimize catabolism of poorly available carbon sources. The results of this study suggest that *C. cellulolyticum* is adapted to life at low nutrient concentrations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Commission of European Communities FAIR programme [contract no. CT 95-0191 (DG 12 SSMA)] and by the programme Agrice (no. 9701041). The authors thank Michel Mercy of Laboratoire de Catalyse Hétérogène for his technical assistance.

REFERENCES

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.

Bryant, M. P. (1972). Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am J Clin Nutr* **25**, 1324–1328.

Cailliez, C., Benoit, L., Thirion, J.-P. & Petitdemange, H. (1992). Characterization of 10 mesophilic cellulolytic clostridia isolated from a municipal solid waste digester. *Curr Microbiol* **25**, 105–112.

Gehin, A., Gelhaye, E., Raval, G. & Petitdemange, H. (1995).

Clostridium cellulolyticum viability and sporulation under cellobiose starvation conditions. *Appl Environ Microbiol* **61**, 868–871.

Gehin, A., Cailliez, C., Petitdemange, E. & Benoit, L. (1996). Studies of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 under dialysis and co-culture conditions. *Lett Appl Microbiol* **23**, 208–212.

Gelhaye, E., Gehin, A. & Petitdemange, H. (1993a). Colonization of crystalline cellulose by *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3154–3156.

Gelhaye, E., Petitdemange, H. & Gay, R. (1993b). Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose. *J Bacteriol* **175**, 3452–3458.

Giallo, J., Gaudin, C., Belaich, J.-P., Petitdemange, E. & Caillet-Mangin, F. (1983). Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic *Clostridium* sp. strain H10. *Appl Environ Microbiol* **45**, 843–849.

Gottschalk, G. (1985). *Bacterial Metabolism*, 2nd edn. New York/Heidelberg/Berlin: Springer.

Holms, H. (1996). Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **19**, 85–116.

Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol* **33**, 117–132.

Klingenberg, M. (1965). Nicotinamide-adenine dinucleotides (NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH). Spectrophotometric and fluorimetric methods. In *Methods in Enzymatic Analysis*, pp. 2045–2059. Edited by H. Y. Bergmeyer. New York: Academic Press.

Koch, A. L. (1997). Microbial physiology and ecology of slow growth. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 305–318.

Kuznetsov, S. I., Dubinina, G. A. & Lapteva, N. A. (1979). Biology of oligotrophic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **33**, 377–387.

Leschine, S. B. (1995). Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu Rev Microbiol* **49**, 399–426.

London, J. & Knight, M. (1966). Concentrations of nicotinamide nucleotide coenzymes in micro-organisms. *J Gen Microbiol* **44**, 241–254.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* **31**, 426–428.

Mokrasch, L. C. (1967). Use of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid for the coestimation of amines, amino acids and proteins in mixtures. *Anal Biochem* **18**, 64–71.

Mortenson, L. E., Valentine, R. C. & 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.

Payot, S., Guedon, E., Cailliez, C., Gelhaye, E. & Petitdemange, H. (1998). Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth. *Microbiology* **144**, 375–384.

Petitdemange, E., Caillet, F., Giallo, J. & Gaudin, C. (1984). *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic mesophilic species from decayed grass. *Int J Syst Bacteriol* **34**, 155–159.

Sleat, R., Mah, R. & Robinson, R. (1984). Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **48**, 88–93.

Tomme, P., Warren, R. A. J. & Gilkes, N. R. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microbiol Physiol* **37**, 1–81.

Vasconcelos, I., Girbal, L. & Soucaille, P. (1994). Regulation of carbon and electron flux in *Clostridium acetobutylicum* grown in

E. GUEDON and OTHERS

chemostat culture at neutral pH on mixture of glucose and glycerol. *J Bacteriol* 176, 1443–1450.

Weimer, P. J. & Zeikus, J. G. (1977). Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl Environ Microbiol* 33, 289–297.

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.

.....
Received 2 February 1999; revised 31 March 1999; accepted
30 April 1999.

III. Discussion

Ces résultats établissent pour la première fois le rôle central du flux carboné dans l'inhibition de croissance de *Clostridium cellulolyticum*. L'analyse des flux métaboliques a révélé la chronologie de l'inhibition de croissance en culture discontinue. L'excrétion du pyruvate par la cellule atteint une valeur de vitesse spécifique maximale coïncidant avec l'arrêt brutal de la croissance de *Clostridium cellulolyticum* ainsi qu'avec la production de lactate. En chémostat, l'augmentation progressive de la concentration en cellobiose et le maintien de conditions de carbone limitant, ont permis d'augmenter la biomasse de manière significative ; 863 mg.l⁻¹ de biomasse sont atteints lorsque la concentration du cellobiose limitante est de 6 g.l⁻¹ contre 487 mg.l⁻¹ en saturation de cellobiose. Au-delà de cette concentration, une chute de la biomasse et une accumulation du cellobiose résiduel sont observées, traduisant le passage de la culture en conditions de carbone saturant (Guedon *et al.*, 2000b). En accord avec les résultats précédents obtenus sur milieu synthétique (Guedon *et al.*, 1999b, 2000b), *Clostridium cellulolyticum* est parfaitement capable de gérer le flux des électrons puisque les rapports NADH/NAD⁺ restent toujours inférieurs à 1.

En cultivant *Clostridium cellulolyticum* en tubes à dialyse, des densités de population très élevées étaient obtenues ; il en avait été conclu que l'inhibition de croissance était le résultat de l'accumulation des produits inhibiteurs issus de la fermentation (Géhin *et al.*, 1996b ; Landwall et Holme, 1977). Les cultures en chémostat avec une augmentation en paliers des concentrations limitantes de cellobiose, permettent d'écarter définitivement cette hypothèse puisque aucun produit n'est éliminé en cours de culture. Une culture en dialyse permet d'obtenir effectivement une forte augmentation de la population, non pas grâce à l'élimination des produits de fermentation, mais plutôt à cause de la diffusion limitante du cellobiose de l'extérieur vers l'intérieur du tube à dialyse. En effet, d'une part, la concentration résiduelle de cellobiose mesurée à l'intérieur du tube reste négligeable et, d'autre part, *Clostridium cellulolyticum* se développe avec des temps de génération plus longs qu'en culture discontinue et surtout continuellement décroissants ce qui indique une limitation de la croissance.

L'inhibition de la croissance n'est donc due ni à une carence nutritionnelle (Giallo *et al.*, 1983), ni aux produits du catabolisme fermentaire tels que les acides ou les solvants (Biebl *et al.*, 1991 ; Herrero et Gomez, 1980 ; Herrero *et al.*, 1982 ; Russell et Diez-Gonzalez, 1998 ; Zeng *et al.*, 1994), ni à la biosynthèse de signaux moléculaires (Dunny et Leonard, 1997). L'arrêt de croissance est le résultat d'un flux carboné entrant insuffisamment régulé et trop élevé qui semble corrélé à une accumulation de composé(s) intracellulaire(s) toxique(s) comme le suggère la présence de pyruvate extracellulaire. Chez d'autres micro-organismes, une telle excrétion de pyruvate a déjà été observée. Le pyruvate en tant qu'inhibiteur direct de la croissance s'expliquerait par l'accumulation de sa forme anionique à des concentrations toxiques pour la cellule (Collins *et al.*, 1972 ; Russell, 1992), mais ceci n'a cependant encore jamais été démontré expérimentalement. Chez *Selenomonas ruminantium*, cette

accumulation intracellulaire est à l'origine de l'activation de la lactate déshydrogénase (LDH) (Wallace, 1978 ; Melville *et al.*, 1988). Chez *Eubacterium limosum*, la présence de pyruvate extracellulaire est associée à l'inhibition de croissance et traduit une limitation de la voie métabolique générant l'acétyl-CoA (Lebloas *et al.*, 1993).

Il n'est pas exclu que l'inhibition de croissance soit en fait la conséquence de l'accumulation d'autre(s) intermédiaire(s) métabolique(s) entraînant l'excrétion du pyruvate. Cependant peu d'exemples ont été jusqu'à présent mis en évidence :

- Chez *Bacillus subtilis*, l'accumulation de glucose 1-phosphate serait associée aux phénomènes de lyse cellulaire (Prasad et Freese, 1974), mais chez *Clostridium cellulolyticum* aucune lyse n'est observée tant que la source de carbone n'est pas complètement épuisée (Payot *et al.*, 1999a).
- Certains triose-phosphates tels que le glycéraldéhyde 3-phosphate ou la dihydroxyacétone phosphate ont parfois été mis en cause (Böck et Neidhart, 1966 ; Cozzarelli *et al.*, 1965). Cependant chez *Clostridium cellulolyticum*, il s'avère que la concentration intracellulaire de ces composés varie très peu lorsque les flux carbonés entrants sont plus élevés (Guedon *et al.*, 1999b).
- Une autre possibilité est la production de méthylglyoxal dont la cytotoxicité est très marquée (Thornalley *et al.*, 1990). Ce composé est un intermédiaire d'une voie métabolique produisant du D-lactate (Russell, 1998). La dihydroxyacétone phosphate est d'abord convertie en méthylglyoxal par une méthylglyoxal synthase (EC 4.2.99.11), puis en D-lactate par une méthylglyoxalase (EC 4.4.1.5). Cette voie métabolique se mettrait en place lors d'un découplage énergétique entre l'anabolisme et le catabolisme, notamment lors d'une croissance en condition d'azote limitant (Cooper, 1984 ; Russell et Cook, 1995). Chez les clostridia aucun exemple d'inhibition par le méthylglyoxal n'a été rapporté, mais chez *Clostridium sphenoides* du D-lactate a été détecté (Gottschalk, 1986) tandis que chez *Clostridium acetobutylicum* une méthylglyoxal synthase est présente (Huang *et al.*, 1999). Chez *Clostridium cellulolyticum* seul du L-lactate est détecté (Guedon *et al.*, 1999b, 2000b).
- Le dernier intermédiaire métabolique jusqu'ici rapporté comme potentiellement inhibiteur de la croissance est l'acétaldéhyde. Sa toxicité est due à la forte réactivité de la fonction aldéhyde avec la fonction amine des composés cellulaires (Jones, 1989).

De la même manière que l'inhibition de croissance sur milieu complexe n'a pas la même origine que sur milieu synthétique, il est nécessaire de vérifier que l'hypothèse d'une inhibition due à un flux carboné trop élevé peut également s'appliquer lors d'une croissance sur cellulose.

B. La fermentation de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum* en culture discontinue

I. Introduction

Jusqu'à présent le métabolisme de *Clostridium cellulolyticum* a essentiellement été étudié avec le cellobiose comme seule source de carbone. La seule étude du métabolisme de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum* a montré que cette bactérie devait être considérée comme faiblement cellulolytique (Giallo *et al.*, 1985). Il faut en effet plus de 15 jours pour atteindre 70% de dégradation avec une concentration initiale en cellulose inférieure à 7,6 g.l⁻¹. En fonction du temps de culture, la vitesse de la dégradation de la cellulose pouvait être divisée en trois zones correspondant à trois types d'activités enzymatiques distinctes. Cette limitation de la cellulolyse, attribuée au système cellulosique, était expliquée par un changement de la structure cristalline de la cellulose résiduelle qui devenait plus récalcitrante à l'hydrolyse enzymatique. Sur cellulose, l'inhibition de croissance était d'autant plus marquée qu'il était suggéré que les cellodextrines solubles issues de la cellulolyse inhibaient à la fois la croissance et la production des cellulases (Petitdemange *et al.*, 1992).

Comme pour les premières études sur cellobiose (Giallo *et al.*, 1983), ces résultats étaient critiquables puisqu'ils étaient issus de cultures en flacons de type "pénicilline" autrement dit sans agitation du milieu de culture, sans régulation du pH et où les gaz issus de la fermentation s'accumulaient (Chung, 1976 ; Lamed *et al.*, 1988). Les études récentes ont montré l'importance du milieu de culture sur les régulations du métabolisme de *Clostridium cellulolyticum*. Les flux du carbone et des électrons sont mieux régulés et contrôlés sur un milieu synthétique que sur un milieu complexe (Guedon *et al.*, 1999b). Par ailleurs, la dernière étude a montré l'importance du flux carboné sur le métabolisme et plus particulièrement sur l'inhibition de croissance chez *Clostridium cellulolyticum* (Guedon *et al.*, 1999a).

Par rapport aux cultures sur cellobiose, la croissance de bactéries cellulolytiques possédant un cellulosome diffère principalement par la nécessité pour les bactéries d'adhérer dans un premier temps au substrat qui est insoluble et ensuite de le dégrader en substrat soluble afin d'initier la croissance. Selon le modèle de la croissance de *Clostridium cellulolyticum* sur la cellulose (Gehin *et al.*, 1996 ; Gelhaye, 1993 ; Gelhaye *et al.*, 1993b, 1993c), des conditions en carbone limitant et saturant seraient rencontrées en alternance par les cellules bactériennes. Ainsi, sur cellulose le métabolisme de *Clostridium cellulolyticum* se situerait entre celui associé à une saturation de cellobiose quand les bactéries adhèrent aux fibres de cellulose et à une limitation de cellobiose quand les bactéries sont relarguées suite à la saturation ou à l'hydrolyse du site d'adhésion (Guedon *et al.*, 1999b, 2000b).

Le but de cette étude est d'établir l'efficacité d'hydrolyse de la cellulose dans de nouvelles conditions de culture, c'est à dire en bioréacteur à pH régulé et sur milieu synthétique, et de voir dans quelle mesure les résultats précédemment obtenus en culture discontinue sur cellobiose sont transposables sur cellulose.

II. Résultats

Les résultats de cette étude ont conduit à la publication d'un article dans la revue *Applied and Environmental Microbiology* : "Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium." 2000, 66 : 2461-2470.

Cellulose Catabolism by *Clostridium cellulolyticum* Growing in Batch Culture on Defined Medium

MICKAËL DESVAUX, EMMANUEL GUEDON, AND HENRI PETITDEMANGE*

Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +, Domaine Scientifique Victor Grignard, Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cédex, France

Received 11 January 2000/Accepted 27 March 2000

A reinvestigation of cellulose degradation by *Clostridium cellulolyticum* in a bioreactor with pH control of the batch culture and using a defined medium was performed. Depending on cellulose concentration, the carbon flow distribution was affected, showing the high flexibility of the metabolism. With less than 6.7 g of cellulose liter⁻¹, acetate, ethanol, H₂, and CO₂ were the main end products of the fermentation and cellulose degradation reached more than 85% in 5 days. The electron flow from the glycolysis was balanced by the production of H₂ and ethanol, the latter increasing with increasing initial cellulose concentration. From 6.7 to 29.1 g of cellulose liter⁻¹, the percentage of cellulose degradation declined; most of the cellulase activity remained on the cellulose fibers, the maximum cell density leveled off, and the carbon flow was reoriented from ethanol to acetate. In addition to that of previously indicated end products, lactate production rose, and, surprisingly enough, pyruvate overflow occurred. Concomitantly the molar growth yield and the energetic yield of the biomass decreased. Growth arrest may be linked to sufficiently high carbon flow, leading to the accumulation of an intracellular inhibitory compound(s), as observed on cellobiose (E. Guedon, M. Desvaux, S. Payot, and H. Petitdemange, *Microbiology* 145:1831–1838, 1999). These results indicated that bacterial metabolism exhibited on cellobiose was distorted compared to that exhibited on a substrate more closely related to the natural ecosystem of *C. cellulolyticum*. To overcome growth arrest and to improve degradation at high cellulose concentrations (29.1 g liter⁻¹), a reinoculation mode was evaluated. This procedure resulted in an increase in the maximum dry weight of cells (2,175 mg liter⁻¹), cellulose solubilization (95%), and end product concentrations compared to a classical batch fermentation with a final dry weight of cells of 580 mg liter⁻¹ and 45% cellulose degradation within 18 days.

Cellulolytic clostridia play a major role in cellulose decomposition, which is a key process in carbon cycling (29). *Clostridium cellulolyticum* is a nonruminant cellulolytic mesophilic bacterium isolated from decayed grass and capable of degrading crystalline cellulose (36). The biotechnological exploitation of this microorganism as well as the understanding of the role it plays in its own ecosystem requires knowledge of its metabolism and of its behavior when developed on cellulose.

C. cellulolyticum is a low-G+C gram-positive anaerobe belonging to clostridial group III (39, 40); it is also placed in family 4, genus 2, in a new proposed-hierarchical structure for clostridia (7). Recent metabolic investigations with this bacterium indicated that (i) compared to a complex medium previously used, mineral salt medium clearly produced a different regulatory response and permitted better control of the carbon flow (19, 34), (ii) early growth inhibition was associated with a carbon excess (18), and (iii) carbon-limited and carbon-saturated chemostats displayed major discrepancies in the regulation of carbon flow (20). These studies were performed using cellobiose, which is considered the most important end product of the enzymatic cellulose hydrolysis (31, 44, 45), and it was assumed that growth on cellulosic material was rather difficult to monitor and that metabolism changes would be more observable with soluble sugar (14, 17).

Concerning the behavior of *C. cellulolyticum* towards cellu-

lose substrate, earlier studies (i) suggested that the release of soluble sugars inhibited both cell growth and cellulase production (37) and (ii) described the growth of the bacteria on cellulose in terms of adhesion, colonization, release, and readhesion processes (13). These experiments, however, were conducted systematically in complex media without pH regulation, and many of the effects observed may have been due to a decrease in the pH of these cultures (47). In fact, compared with other low-G+C gram-positive anaerobes, particularly with bacteria defined as lactic acid bacteria, the bacteria of the clostridial type are generally considered to be restricted to a less acidic ecological niche due to their particular pattern of intracellular pH regulation (21, 41).

Bacterial growth on cellulose differs from that on cellobiose by the necessity for bacteria first to adhere on the substrate and second to degrade it into soluble sugars. Thus both substrate limitation and substrate-sufficient periods could be encountered by bacteria, and so the carbon flow on a cellulose batch culture could be somewhere between that associated with carbon limitation when bacteria are released and that associated with carbon-sufficient conditions when bacteria have adhered to cellulose fibers.

The aim of the present work was to investigate how *C. cellulolyticum* managed the abundance of insoluble substrate and to see whether or not the previous observations of cellobiose (15, 17–20, 34) were typical of bacterial behavior on cellulose. Taking into account previous considerations, this investigation on the metabolism and cellulolytic performance of *C. cellulolyticum* in batch fermentations was performed with controlled pH and using a mineral salt-based medium, which is more representative of the natural ecosystem of the bacterium.

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +, Domaine Scientifique Victor Grignard, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cédex, France. Phone: 33 3 83 91 20 53. Fax: 33 3 83 91 25 50. E-mail: hpetitde@lcb.u-nancy.fr.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals were of highest-purity analytical grade. Unless mentioned otherwise, commercial reagents, enzymes, and coenzymes were supplied from Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. All gases used were purchased from Air Liquide, Paris, France.

Organism and medium. *C. cellulolyticum* ATCC 35319 was isolated from decayed grass by Petitdemange et al. (36). Stocks of spores from the original isolation, stored at 4°C, were heated to 80°C for 10 min and inoculated on cellulose medium (28, 51). Cells were subcultured once on cellobiose or cellulose before transfer and growth in a bioreactor as previously described (18). The anaerobic culture technique used was that proposed by Hungate (23) as modified by Bryant (6).

The defined medium used in all experiments was a modified CM3 medium as described previously by Guedon et al. (18). This medium contained cellobiose or cellulose MN301 (formerly MN300; Macherey-Nagel, Düren, Germany) in various amounts as specified in Results.

Growth conditions. *C. cellulolyticum* was grown in batch culture with cellobiose or cellulose as the sole carbon and energy source as previously described by Guedon et al. (18). Bacteria were cultured aseptically in a 2-liter bioreactor (LSL Biolafitte, St. Germain en Laye, France) with a 1.5-liter working volume. The temperature was maintained at 34°C, and the pH was controlled at 7.2 by automatic addition of 3 N NaOH. Agitation was kept constant at 50 rpm. The inoculum was 10% by volume from an exponentially growing culture. Cellulose bioreactors were connected to a gasometer filled with a saturated NaCl-water solution and acidified at pH 1.0 with H₂SO₄ to prevent gas dissolution as described by Pollack (38). All tubing was made of Viton to preserve the anoxic condition of the cell culture.

Analytical procedures. Cell growth on cellobiose was monitored spectrophotometrically at 600 nm and calibrated against cell dry weight measurement as previously described (18). On cellulose, biomass was estimated by bacterial protein measurement (33). From bacteria growing on cellobiose a cell dry weight-protein correlation was established, and this correlation was assumed to be the same for cells grown on particulate cellulose. Protein was measured by a modification of the Bradford dye method (5) as follows. A sample (30 ml) was centrifuged (8,000 × g for 15 min at 4°C) and washed twice with 0.9% (wt/vol) NaCl. The pellet was resuspended in 2 ml of 0.2 N NaOH, and this suspension was placed in a boiling water bath for 10 min (50). After cooling, the hydrolyzed sample was centrifuged as described above and the supernatant was diluted in 0.2 N NaOH as well as crystalline bovine serum albumin, which was used as the standard. The protein concentration was then estimated using the Coomassie brilliant blue reagent and reading the absorbance at 595 nm.

Cellulose concentration was determined as described by Huang and Forsberg (22). Residual cellulose was washed using acetic acid-nitric acid reagent and water to achieve removal of noncellulosic materials as described by Updegraff (46). Cellulose was then quantified by using the phenol-sulfuric acid method (8, 9) with glucose as the standard. Equivalent anhydroglucose was used for calculation.

The relative crystallinity index of the cellulose was determined as described by Shi and Weimer (43) following a technique that removed adherent microbial cells and prevented the recrystallization of the cellulose (26).

Hydrogen and carbon dioxide were analyzed on a gas chromatography unit as previously described (19). Gases dissolved in the culture medium were liberated using concentrated sulfuric acid as described by Freier et al. (12).

Culture supernatants (10,000 × g, 15 min, 4°C) were stored at -80°C until they were analyzed. The reducing sugar concentration was determined by a colorimetric ferricyanide method (32) using glucose as the standard. Glucose was assayed enzymatically using glucose oxidase and peroxidase, with *o*-dianisidine as a chromophore.

Acetate, ethanol, lactate, and succinate levels were determined using the appropriate enzyme kits (Boehringer Mannheim, Meylan, France).

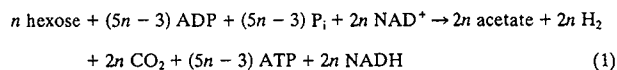
Extracellular pyruvate was assayed enzymatically by fluorometric detection of NADH as previously described (18).

Total cellulase activity was based on the avicelase determination method described by Wood and Bhat (52). Incubation was performed at 34°C in 25 mM phosphate buffer (pH 7.2) using cellulose MN301 as the substrate. Liberation of reducing sugars was measured by the method of Miller (30) with glucose as the standard. One unit of total cellulase activity was defined as the amount of enzyme which released 1 μmol of reducing sugar per min.

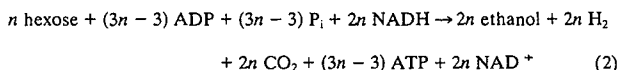
All experiments were carried out in triplicate and repeated if experimental variation exceeded 10%.

Calculations. The main products of cellulose fermentation by *C. cellulolyticum* were acetate, ethanol, lactate, H₂, and CO₂ (see Results). Balance equations were established taking into account previous investigations (20, 34) and compiled in Fig. 1. Since cellobioses are water-soluble β-1,4 oligomers of glucose with degrees of polymerization (*n*) between 2 and 7 (35) it was assumed that carbohydrates from glucose to cellobiose could potentially be incorporated by bacteria. The cellulose fermented into products that can then be expressed as *n* hexose equivalents (hexose eq), which correspond to the glucose residue inside the cellulose chain. As specified in the scheme of cellulose catabolism (Fig. 1), it was assumed that (i) two ATP molecules were consumed for the transport system (42), (ii) one molecule of glucose and (*n* - 1) molecules of glucose-1-phosphate

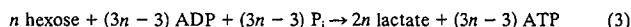
were formed from one molecule of soluble β-glucan (*n*) (1 ≤ *n* ≤ 7) according to the model of Strobel (44), (iii) the net ATP formation from glucose to pyruvate via the Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway was two molecules of ATP, (iv) a balance of three molecules of ATP was produced by the EMP pathway from glucose-1-phosphate, (v) there was production of two extra ATP molecules per hexose equivalent by acetate kinase, (vi) two NAD⁺ molecules per hexose eq were reduced by GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), (vii) two molecules of NAD⁺ per hexose eq were formed by the lactate dehydrogenase, and (viii) four molecules of NADH per hexose eq were reoxidized by acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase. Then the cellulose conversion can be written as a general equation as follows. The equation for the conversion to acetate is



The equation for the conversion to ethanol is



And the equation for the conversion to lactate is



The energetic yield of biomass (*Y*_{ATP}) was estimated from acetate, ethanol, and lactate concentrations. From equation 1, when a molecule of acetate was formed, (5*n* - 3)/2*n* molecules of ATP were produced. For example, if *n* = 1 (glucose), then 2 acetate molecules and 2 ATP molecules are produced, i.e., 1 ATP molecule per acetate molecule; if *n* = 2 (cellobiose), 4 acetate molecules and 7 ATP molecules are produced, i.e., 1.75 ATP molecules per acetate molecule; if *n* = 3 (cellotriose), 6 acetate molecules and 12 ATP molecules are produced, i.e., 2 ATP molecules per acetate molecule. From equations 2 and 3, when a molecule of ethanol or lactate was formed, (3*n* - 3)/2*n* ATP molecules were produced. For example, if *n* = 1, no ATP molecules and either 2 ethanol molecules or 2 lactate molecules are produced, i.e., 0 ATP molecules per ethanol or lactate molecule; if *n* = 2, 3 ATP molecules and either 4 ethanol molecules or 4 lactate molecules are produced, i.e., 0.75 molecules of ATP per ethanol or lactate molecule; if *n* = 3, 6 ATP molecules and either 6 ethanol molecules or 6 lactate molecules are produced, i.e., 1 ATP molecule per ethanol or lactate molecule. So from *n* = 1 to 7 averages of 1.94 ATP molecules per acetate molecule and 0.94 ATP molecules per ethanol or lactate molecule were found and *Y*_{ATP} was estimated as follows: *Y*_{ATP} = biomass concn/(1.94 concn_{acetate} + 0.94 concn_{ethanol} + 0.94 concn_{lactate}) where concn stands for concentration and *Y*_{ATP} is expressed in grams of cells per mole of ATP produced.

The molar growth yield, *Y*_{X/S}, is expressed in grams of cells per mole of hexose fermented. The *q*_{hexose} is the specific rate of anhydroglucose residue fermented in millimoles per gram of cells per hour. *q*_{acetate}, *q*_{ethanol}, *q*_{lactate}, *q*_{hydrogen}, and *q*_{carbon dioxide} are the specific rates of product formation in millimoles per gram of cells per hour. Extracellular *q*_{pyruvate} is the specific rate of extracellular pyruvate formation in micromoles per grams of cells per hour. The specific production or utilization rates were the derivatives of the time course plots.

RESULTS

Cellulose degradation by *C. cellulolyticum* in batch cultures.

C. cellulolyticum was grown in batch culture on synthetic medium at pH 7.2 with seven concentrations of cellulose MN301: 5.6, 14.8, 24.1, 41.4, 78.4, 116.7, and 179.6 mM, expressed as hexose eq, i.e., 0.9, 2.4, 3.9, 6.7, 12.7, 18.9, and 29.1 g of cellulose liter⁻¹, respectively. The percentage of solubilized cellulose within 120 h as a function of the initial cellulose concentration was determined (Fig. 2), and it was found that around 91% degradation was achieved with less than 3.9 g of initial cellulose liter⁻¹, but this percentage dropped and reached 21% with the highest cellulose concentration. Such a decrease indicated that approximately the same amount of cellulose was hydrolyzed so that cellulolysis performances were close to their maximum at and above 3.9 g of cellulose added liter⁻¹. In fact, the maximum dry weight of cells increased with initial cellulose amount, and above 6.7 g liter⁻¹ it remained quite constant around 575 mg liter⁻¹ (Fig. 2). The maximum rate of cellulose degradation measured in the course of each fermentation paralleled the maximum cell dry weight and reached about 1.5 × 10⁻³ g liter⁻¹ min⁻¹ at and above 6.7 g of

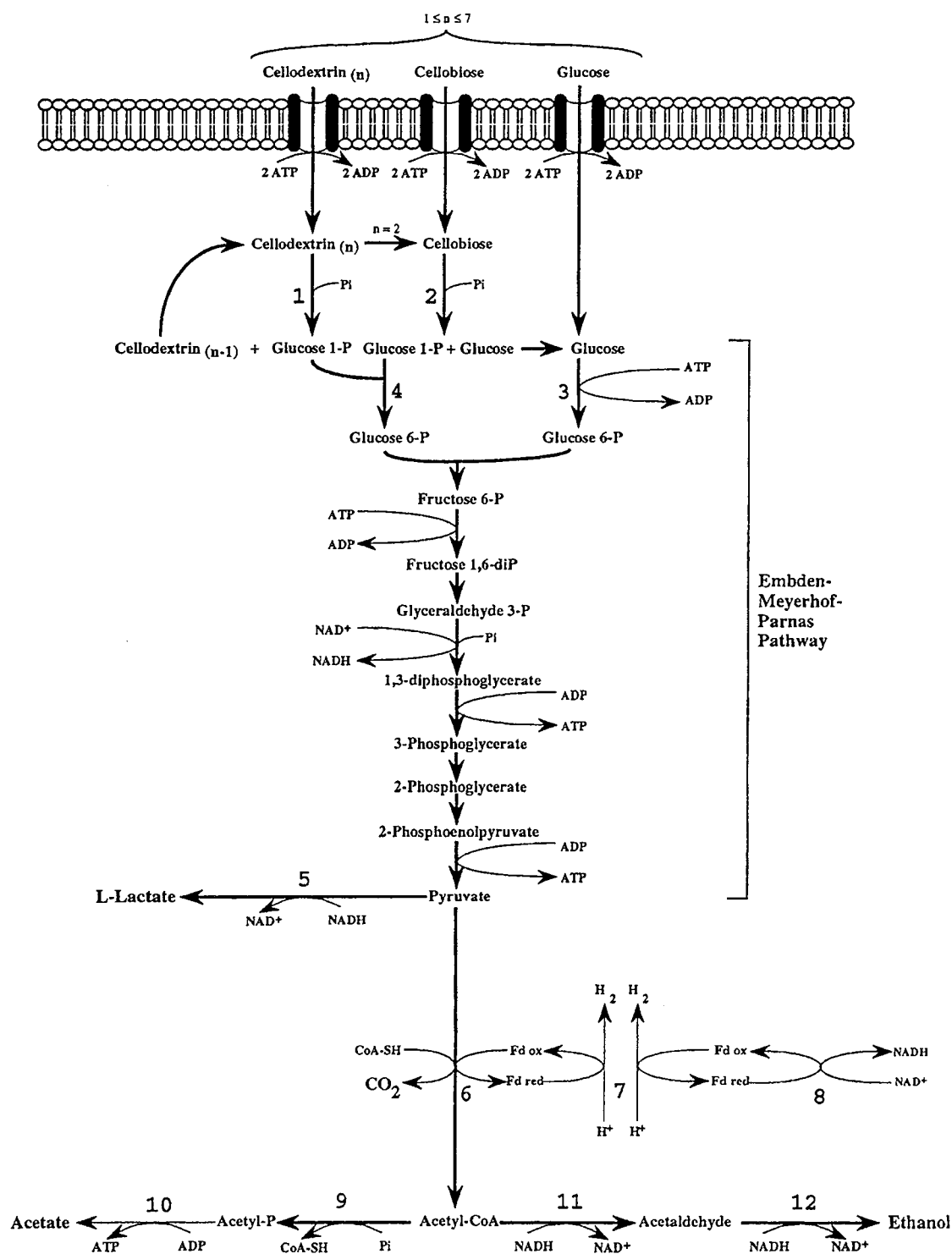


FIG. 1. Scheme of the catabolism of cellulose by *C. cellulolyticum*. Total cellulase activity liberated soluble β -glucans (n , the number of hexose residues inside the polymer) (i.e., $1 \leq n \leq 7$), which were then incorporated and metabolized by bacteria. 1, cellodextrin phosphorylase (EC 2.4.1.49); 2, cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20); 3, glucokinase (EC 2.7.1.2); 4, phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2); 5, L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27); 6, pyruvate-fd oxidoreductase (EC 1.2.7.1); 7, hydrogenase (EC 1.18.99.1); 8, NADH-fd reductase (EC 1.18.1.3); 9, phosphotransacetylase (EC 2.3.1.8); 10, acetate kinase (EC 2.7.2.1); 11, acetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.10); 12, Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1). CoA-SH, coenzyme A; ox, oxidized; red, reduced. Fd, ferredoxin.

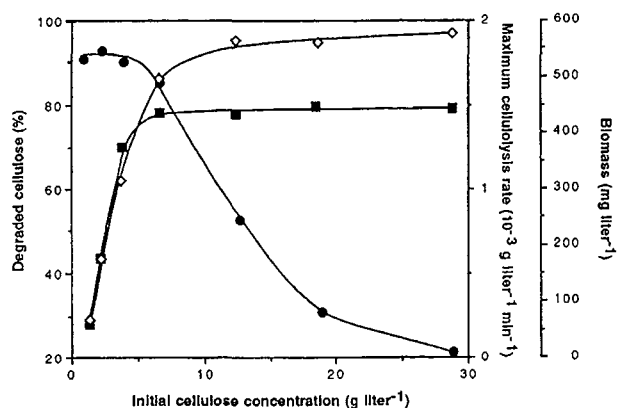


FIG. 2. The percentage of solubilized cellulose ●, maximum biomass ◇, and maximum rate of cellulose degradation ■ reached within 120 h of batch fermentation of *C. cellulolyticum* as a function of the initial cellulose concentration.

cellulose added liter⁻¹. The rate of cellulose hydrolysis appeared therefore to be related to biomass production, and this partly explained why the percentage of degradation was restricted above 3.9 g of cellulose added liter⁻¹.

The kinetics of cellulose solubilization within 120 h of fermentation showed similar patterns whatever the initial cellulose concentration (Fig. 3a). Cellulose hydrolysis increased up to 50 to 70 h and then began to slow down. From 0.9 to 3.9 g of initial cellulose liter⁻¹, the decrease of cellulose degradation was due to an exhaustion of the cellulose, but above 6.7 g of cellulose liter⁻¹ this slowdown was not correlated with the cellulose depletion or a change in the crystalline structure of the cellulose. For example, at the end of the fermentation with 6.7 g of initial cellulose liter⁻¹, the relative crystallinity index was 89.6 compared with 89.9 for the original cellulose MN301. Consequently, residual cellulose was not enriched in its crystalline content in the course of the cell culture.

To understand the variation of cellulolysis, the total cellulase activity during the fermentation was then examined. With increasing initial cellulose concentration, the maximum of pellet-associated cellulase activity, including cells with cellulosome and free cellulosome adhered to cellulose fibers (2, 13, 14), rose (Fig. 3b). A peak in activity was hit between 50 and 80 h, and activity then decreased. During fermentations with initial substrate concentrations higher than 12.7 g liter⁻¹, the maximum cellulase activity in the pellet remained quite constant around 4.4×10^{-2} IU ml⁻¹ and the later decline was slower than with lower cellulose concentrations. In the supernatant, the cellulase activity appeared after about 24 h and reached higher values as the initial cellulose concentration increased from 0.9 to 6.7 g of cellulose liter⁻¹ (Fig. 3c). Above 6.7 g of initial cellulose liter⁻¹, however, the previous upward trend was reversed and little cellulase activity was measured in the supernatant. At 120 h, about 90% of the total cellulase activity was in the pellet with the highest initial substrate concentration, while with 6.7 g of cellulose liter⁻¹ up to 70% of the total activity was in the supernatant. As the maximum degradation rate and biomass production paralleled the maximum cellulase activity in the pellet, the cellulose hydrolyzed was closely linked to the degradative activity measured. Microscopic examination at the end of the cultures revealed that most bacteria adhered to the cellulose particles, but with initial carbohydrate concentrations less than 6.7 g liter⁻¹ many more cells were in the supernatant (data not shown). So the variations in cellulose solubilization in the course of fermentation could be attributed

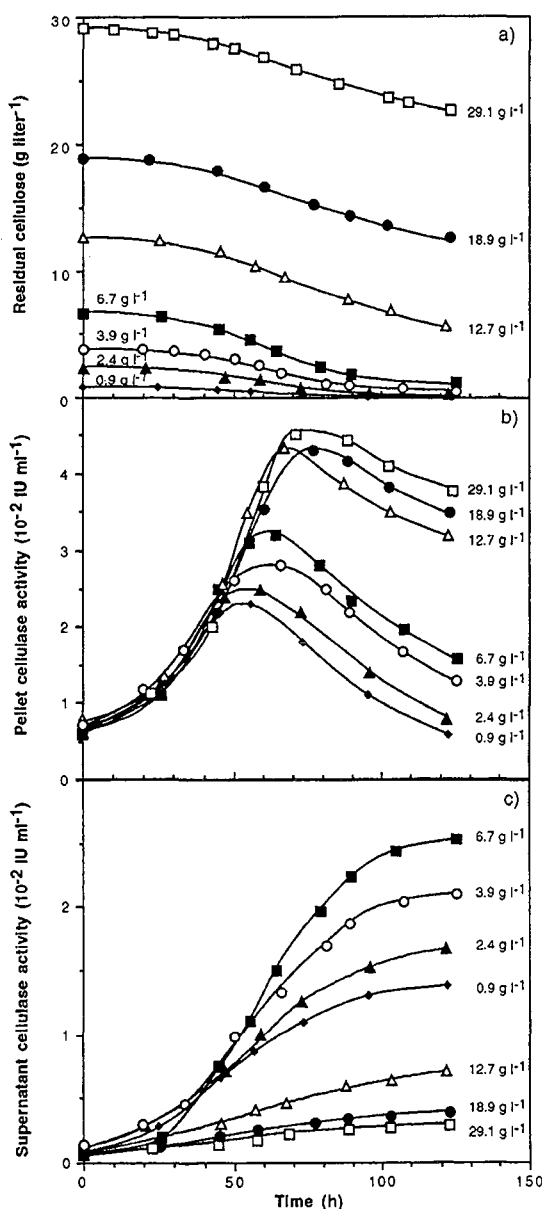


FIG. 3. Kinetics of cellulose consumption (a) and cellulase activity in the pellet (b) and in the culture supernatant (c) during batch fermentation of *C. cellulolyticum* on cellulose at various initial concentrations.

to a release of the cellulase system and of cellulolytic bacteria due to an excess with respect to the number of cellulose particles. These data are in agreement with the model of tight adhesion of the cellulosome as well as bacteria to cellulose fibers as the primary event required in the efficient degradation and growth on insoluble substrates (2, 3).

Accumulation of soluble sugars occurred only after growth ceased (data not shown) but remained limited. At 120 h, with 29.1 g of initial cellulose liter⁻¹, 126 mg of reducing sugars and 15 mg of glucose liter⁻¹, corresponding to 0.55 and 0.06% of the remaining cellulose, respectively, were detected; with 6.7 g of cellulose liter⁻¹, the reducing sugars (77 mg liter⁻¹) and glucose (12 mg liter⁻¹) represented 5.83 and 0.91% of the remaining cellulose, respectively.

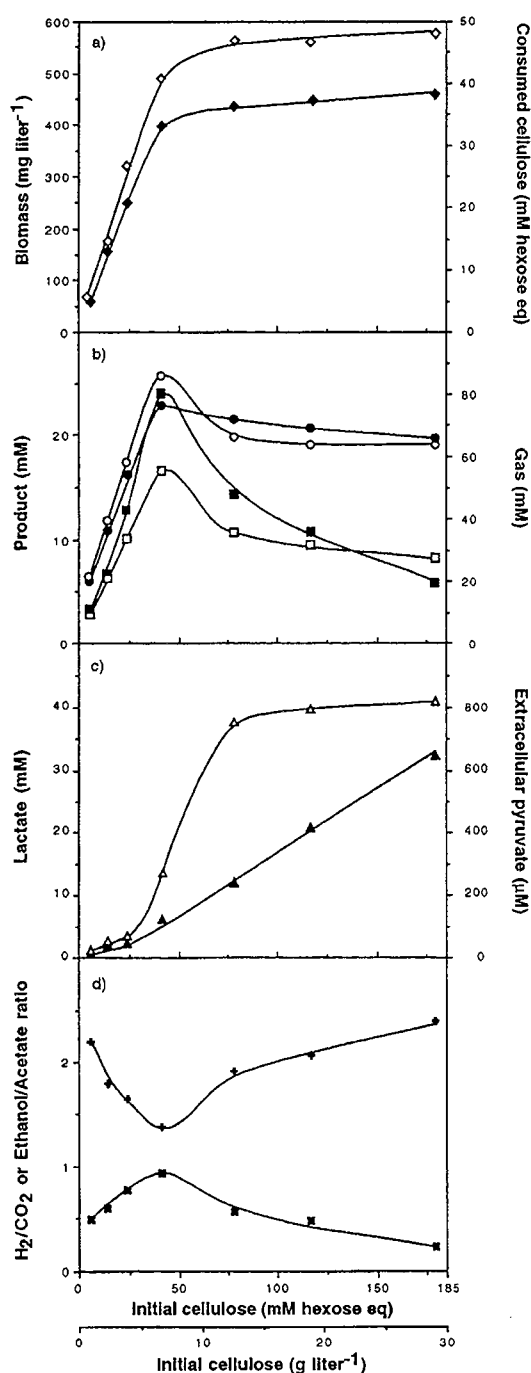


FIG. 4. Maximum biomass and cellulose consumption (a), metabolite concentrations (b and c), and product ratio (d) obtained within 120 h of batch culture of *C. cellulolyticum* as a function of the initial cellulose concentration. \diamond , biomass; \blacklozenge , consumed cellulose as hexose eq; \blacksquare , ethanol; \circ , acetate; \bullet , H_2 ; \square , CO_2 ; \blacktriangle , lactate; \triangle , extracellular pyruvate; \star , ethanol/acetate ratio; \oplus , H_2/CO_2 ratio.

Metabolite production during batch cellulose fermentation.

With increasing amounts of substrate and within 120 h of fermentation, the consumed cellulose concentration, expressed as millimolar hexose eq, rose (Fig. 4a). Above 41.4 mM initial cellulose (i.e., 6.7 g liter⁻¹), the increase in the quantity of consumed cellulose slowed down and the concentration

reached 36.8 mM with 179.6 mM initial cellulose (i.e., 29.1 g liter⁻¹). The production of biomass paralleled the amount of hexose eq consumed. Substrate limitation or inhibition by fermentation products could not explain growth arrest since the same culture, when reinoculated, allowed further growth of a new cell inoculum (see Fig. 6aII).

On cellulose, as previously observed with cellobiose (18–20), acetate, ethanol, lactate, hydrogen, and carbon dioxide were the primary metabolic end products and no succinate was detected. The final levels of H_2 , CO_2 , acetate, and ethanol measured in the course of each fermentation increased linearly with cellulose added (Fig. 4b). But beyond 41.4 mM initial cellulose (i.e., 6.7 g liter⁻¹) and up to the highest cellulose concentration, ethanol concentration decreased continuously from 24.0 to 5.6 mM. The total production of CO_2 and acetate decreased sharply from 41.4 to 78.4 mM initial cellulose (i.e., 6.7 to 12.7 g liter⁻¹, respectively) and was quite constant above 78.4 mM. H_2 production decreased as well, but moderately, since it was 68.6 mM with 41.4 mM initial cellulose (i.e., 6.7 g liter⁻¹) and 58.9 mM with 179.6 mM initial cellulose (i.e., 29.1 g of cellulose liter⁻¹). Conversely, the final lactate concentration was low (less than 1.9 mM) but increased as soon as the initial substrate concentration was 41.4 mM (i.e., 6.7 g liter⁻¹) and reached 32.4 mM with 179.6 mM initial cellulose (i.e., 29.1 g liter⁻¹) (Fig. 4c). In the same way, the maximum extracellular pyruvate concentration rose sharply as soon as lactate was produced. With 41.4 mM initial cellulose (i.e., 6.7 g liter⁻¹) the maximum extracellular pyruvate concentration was 289 μ M and reached 821 μ M with 179.6 mM initial cellulose (i.e., 29.1 g liter⁻¹). From 5.6 to 41.4 mM initial cellulose (i.e., 0.9 to 6.7 g liter⁻¹, respectively), the ethanol-to-acetate ratio increased until it reached 0.93 and then dropped with higher initial carbohydrate concentrations added (Fig. 4d). These data showed that biomass stagnation with cellulose concentrations higher than 41.4 mM (i.e., 6.7 g liter⁻¹) was accompanied by a change in metabolic flux. Carbon flow towards acetate and ethanol dropped while lactate production rose, and a second metabolic shift arose from ethanol-to-acetate formation. The change in the upward trend of the ethanol-to-acetate ratio was also paralleled by a reverse in the downward trend of the H_2 -to- CO_2 ratio (Fig. 4d). This ratio, always higher than 1, suggested that H_2 was produced via NADH-ferredoxin (fd) reductase and hydrogenase activities in addition to the pyruvate-fd oxidoreductase and hydrogenase activities (Fig. 1) (18–20).

Kinetic analysis of fermentation products in batch culture on cellulose.

When *C. cellulolyticum* was grown in batch culture on a defined medium with 179.6 mM initial cellulose (i.e., 29.1 g of cellulose liter⁻¹), the specific production rates of acetate, ethanol, CO_2 , and H_2 accelerated during the first 60 h after inoculation, and this acceleration was followed by decreasing specific production rates (Fig. 5a). During the first 60-h period, the specific rate of lactate production was almost constant and low: around 0.07 mmol (g of cells)⁻¹ h⁻¹ (Fig. 5b). The peak of extracellular pyruvate formation, i.e., 78.60 μ mol (g of cells)⁻¹ h⁻¹, coincided with the start of lactate production. The extracellular $q_{pyruvate}$ decreased continuously, and pyruvate was consumed about 50 h after its maximum production rate was reached. The increasing $q_{lactate}$ with a maximum of 1.17 mmol (g of cells)⁻¹ h⁻¹, corresponded to the decrease in the specific rates of acetate, ethanol, CO_2 , and H_2 production.

With bacterial fermentation on 24.1 mM initial cellulose (i.e., 3.9 g liter⁻¹), the specific production rates of acetate, ethanol, CO_2 , and H_2 followed the same pattern as that previously described, but maximum specific rates attained were

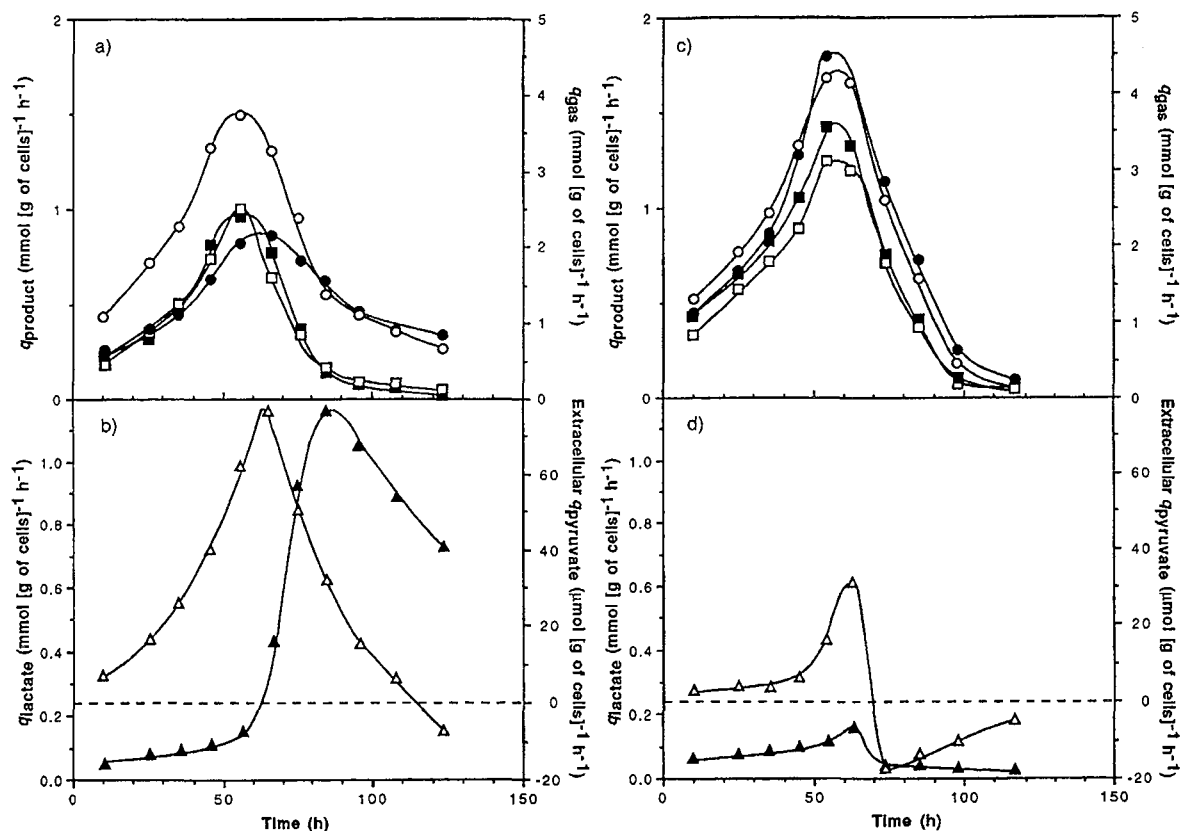


FIG. 5. Specific rates of product formation during batch fermentations of *C. cellulolyticum*. The initial cellulose concentrations were 179.6 mM (i.e., 29.1 g liter⁻¹) (a and b) and 24.1 mM (i.e., 3.9 g liter⁻¹) (c and d). ■, ○, ▲, ●, □, and △, specific rates of ethanol, acetate, lactate, H₂, CO₂, and extracellular pyruvate formation, respectively.

higher and the later decelerating phase was more abrupt (Fig. 5c). A similar increase of q_{lactate} could be observed too (Fig. 5d). Yet after the maximum specific rate of extracellular pyruvate formation was reached, pyruvate was consumed within hours and lactate biosynthesis stopped. As a result, the specific production rates of lactate and extracellular pyruvate were much lower than with a fermentation started at 179.6 mM initial cellulose (i.e., 29.1 g liter⁻¹) since they reached maxi-

imum values of 0.14 mmol (g of cells)⁻¹ h⁻¹ and 30.59 μmol (g of cells)⁻¹ h⁻¹, respectively.

The maximum specific growth rate (μ_{max}) obtained on cellulose was one-third that for batch cellobiose fermentation (Table 1). Whatever the initial cellulose concentration, the μ_{max} was around 0.056 h⁻¹, which corresponded to a generation time of 12.4 h. The maximum q_{hexose} obtained on cellulose was five times lower than that on cellobiose. The carbon flow

TABLE 1. Maximum values^a of specific rates of product formation and consumption, of molar growth yield, and of energetic yield of biomass obtained in the course of the batch fermentations of *C. cellulolyticum*

| Initial concn [mM hexose eq (g liter ⁻¹)] of cellulose or cellobiose | q value (mmol [g of cells] ⁻¹ h ⁻¹) for: | | | | Extracellular q_{pyruvate} (μmol [g of cells] ⁻¹ h ⁻¹) | μ_{max} (h ⁻¹) | $Y_{\text{X/S}}$ ([g of cells] [mol of hexose eq] ⁻¹) | Y_{ATP} ([g of cells] [mol of ATP] ⁻¹) |
|--|---|---------|---------|---------|---|---------------------------------------|--|--|
| | Hexose | Ethanol | Acetate | Lactate | | | | |
| Cellulose | | | | | | | | |
| 5.6 (0.9) | 1.42 | 0.90 | 1.20 | 0.06 | 9.68 | 0.055 | 36.8 | 18.9 |
| 14.8 (2.4) | 1.78 | 1.02 | 1.39 | 0.08 | 10.17 | 0.056 | 36.5 | 19.5 |
| 24.1 (3.9) | 1.93 | 1.43 | 1.68 | 0.14 | 30.59 | 0.057 | 35.7 | 21.2 |
| 41.4 (6.7) | 1.99 | 1.51 | 1.79 | 0.40 | 49.35 | 0.056 | 34.7 | 22.8 |
| 78.4 (12.7) | 2.06 | 1.09 | 1.61 | 0.58 | 80.38 | 0.057 | 25.5 | 12.4 |
| 116.07 (18.9) | 2.13 | 0.98 | 1.58 | 0.74 | 81.45 | 0.055 | 25.9 | 13.8 |
| 179.6 (29.1) | 2.19 | 0.97 | 1.51 | 1.17 | 78.60 | 0.056 | 25.6 | 13.3 |
| Cellobiose | | | | | | | | |
| 46.8 (8.0) | 10.71 | 1.98 | 3.70 | 2.64 | 155.80 | 0.154 | 31.6 | 23.2 |

^a Values are the averages of three different experiments and were determined with an average accuracy of ±10%.

^b The values were the maximum ones encountered during the entire incubation time and were not calculated over the same period of time.

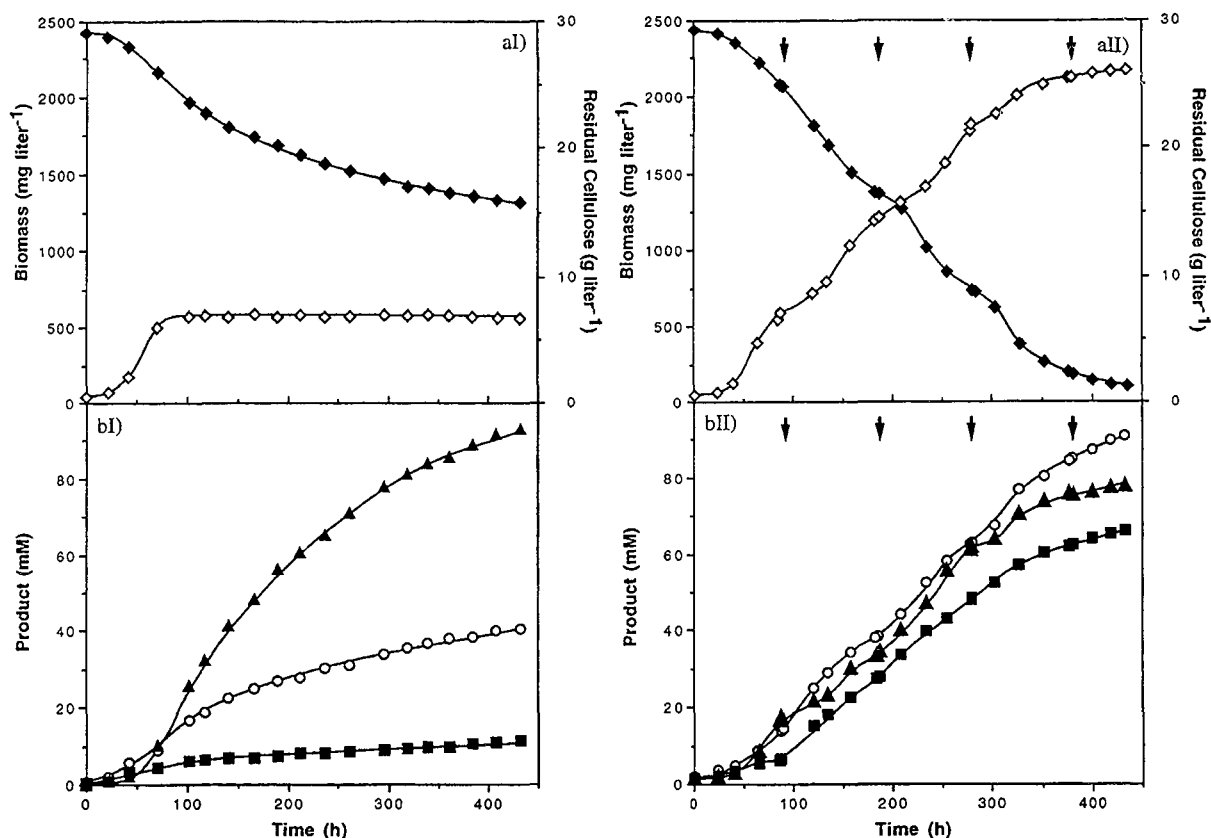


FIG. 6. Growth and residual cellulose concentration (a) and product concentrations (b) during classical batch fermentation (I) and reinoculated culture (II) of *C. cellulolyticum* with 29.1 g of cellulose liter⁻¹. Arrows, reinoculation times. ◇, biomass; ◆, cellulose; ■, ethanol; ○, acetate; ▲, lactate.

entering into the cell increased with cellulose concentration added but remained constant above 41.4 mM initial cellulose (i.e., 6.7 g liter⁻¹), whereas maximum q_{acetate} and q_{ethanol} decreased. At and above 41.4 mM initial cellulose (i.e., 6.7 g liter⁻¹) the maximum q_{lactate} continuously increased, while the extracellular q_{pyruvate} remained constant. On the average, the specific rates of acetate, ethanol, lactate, and extracellular pyruvate formation were at least twofold lower than on cellobiose. With less than 41.4 mM initial cellulose (i.e., 6.7 g liter⁻¹), the molar growth yields remained quite constant, around 35.9 (g of cells) (mol of hexose)⁻¹ and were comparable to that obtained on cellobiose. In this range of initial cellulose concentrations, the same comparison could be done concerning the energetic yield of biomass since Y_{ATP} was about 20.6 (g of cells) (mol of ATP)⁻¹ compared to 23.2 (g of cells) (mol of ATP)⁻¹ on cellobiose. Above 41.4 mM initial cellulose (i.e., 6.7 g liter⁻¹), $Y_{\text{X/S}}$ and Y_{ATP} dropped to about 25.7 (g of cells) (mol of hexose)⁻¹ and 13.2 (g of cells) (mol of ATP)⁻¹, respectively. The decrease in $Y_{\text{X/S}}$ accompanied by that in Y_{ATP} suggested the existence of an uncoupling growth phenomenon, namely, that some catabolized hexose and hence ATP were not associated with biomass production.

Cellulose degradation in a bioreactor reinoculated with *C. cellulolyticum*. With substrate concentrations higher than 6.7 g of cellulose liter⁻¹, cell growth was not limited by available cellulose sites and the growth arrest of the seeding could be explained by a carbon flow which led to an accumulation of an intracellular inhibitory compound(s) (18). Indeed the rate of cellulose catabolism apparently exceeded the rate of pyruvate

consumption, since pyruvate accumulated. Taking into account this hypothesis, a reinoculation process to improve the degradation of high cellulose concentrations was attempted. By this process, when the cells entered the stationary phase (i.e., about every 96 h), a new inoculum of *C. cellulolyticum* was introduced into the bioreactor (Fig. 6). In this way, with 29.1 g of initial cellulose liter⁻¹ (i.e., 179.6 mM cellulose) more than 95% degradation occurred within 18 days (i.e., four reinoculations) against 45% in classical batch fermentation. In the reinoculated culture, the final concentrations of ethanol and acetate were 65.6 and 90.5 mM, respectively (Fig. 6bII) compared to 11.4 and 40.6 mM, respectively, in classical culture (Fig. 6bI). The final lactate concentration (77.3 mM), however, was lower than that in classical batch culture (93.1 mM). A final cell dry weight of 2,175 mg liter⁻¹ was reached with the reinoculation process compared to about 580 mg liter⁻¹ with the classical procedure (Fig. 6aI and 6aII). In classical batch fermentation, once the stationary phase was reached, bacteria acted as resting cells (Fig. 6aI): cellulose was hydrolyzed, cell lysis did not occur within the remaining 14 days, and bacteria were catabolically active since metabolites, mainly lactate, were produced. These data indicated that acetate and ethanol production was associated with cell growth whereas lactate formation paralleled growth inhibition. With the fourth inoculum, the cellulose was not degraded further (Fig. 6aII). In fact, no growth was observed, and, at this time, the cellulose concentration was less than 2 g liter⁻¹; the remaining cellulose was certainly saturated with bacteria coming from the preceding inocula, which were not able to initiate a new cell division and

which did not allow adhesion and growth of cells from a new inoculum. Thus such a reinoculation process allowed improved maximum dry weight of cells, cellulose solubilization, and end product concentrations.

DISCUSSION

Since the early studies of cellulose hydrolysis by *C. cellulolyticum*, this microorganism has been considered a sluggish cellulolytic bacterium (16, 37). It was described as taking half a month to attain about 70% degradation with initial cellulose concentrations lower than 7.6 g liter⁻¹ (16). Moreover, limitation of cellulolysis was attributed to a change in cellulose structure, such as a progressive increase in the lattice crystallinity due to the initial degradation through the cellulasic system. As a result, the kinetics of cellulose degradation could be divided into three distinct periods corresponding to three consecutive enzymatic activity levels.

In the present study, cellulolytic performance of *C. cellulolyticum* was improved, since with initial cellulose concentrations less than 6.7 g liter⁻¹ more than 85% degradation occurred in 5 days. A modification of the crystalline structure of the substrate could not account for the slowdown in the cellulose degradation rate. Changes in the distribution of the cellulase activity (i.e., present on the cells or as a free cellulasic system) between the cellulose fibers and the supernatant explain the slowing down in the cellulose solubilization during the culture. Studies of the fermentation of different cellulose structures by ruminal cellulolytic bacteria indicated that the available surface area was a more important determinant of the digestion rate than the crystallinity of the cellulose (48, 49). Recent investigations of crystalline cellulose degradation by the *Clostridium thermocellum* cellulosome showed that the various cellulase factors acted in unison with a very efficient synergism in which the influence of digestion time on the crystallinity of the substrate was limited (4). In the present investigation, the maximum generation time was greatly reduced (i.e., 12.4 h versus the 24.0 h found by Giallo et al. [16]) and primary metabolite production, i.e., of acetate, ethanol, and lactate, evolved differently (16). These differences could be attributed to several modifications made in the present study such as the use of a synthetic medium (19, 34), the pH regulation in the course of fermentation (11), the continuous stirring of the medium (12, 31), and the fact that the cultures were carried out at atmospheric pressure without accumulation of the fermentation gases inside the bioreactor (12, 27).

With initial cellulose concentrations lower than 41.4 mM (i.e., 6.7 g liter⁻¹), the more the cellulose was hydrolyzed the less the cellulasic system could find new adherence sites on the cellulose fibers. As the initial cellulose amount increased, the biomass production increased and in turn the total culture cellulase activity rose globally but more activity was measured in the supernatant at the end of the fermentation. Since the stationary phase occurred before cellulose was depleted, biomass limitation was more probably due to a lack of available adhesion sites on cellulose as bacteria grew (13, 14). Thus, with less than 41.4 mM cellulose (i.e., 6.7 g liter⁻¹), cellulolysis was limited by both the accessibility of the cellulasic system to cellulose fibers and, as a result, the biomass concentration, which depends on the quantity of soluble cellooligosaccharides released. In this range of cellulose concentrations, the ethanol-to-acetate ratio increased continuously towards 1 and concomitantly less H₂ was produced. So H₂ and ethanol production may regulate the intracellular NADH/NAD⁺ ratio as a result of a good control of the electron flow (18, 19). Likewise,

carbon flow appeared to be correctly regulated since pyruvate overflow did not occur. Moreover, with increasing substrate concentration the flux, which was first mainly directed to acetate production, was partly reoriented to the ethanol pathway, while little lactate was formed. $Y_{X/S}$ and Y_{ATP} values were comparable to those obtained on cellobiose even though q_{hexose} was at least five times lower. In these conditions, cells managed to optimize their growth on cellulose.

With higher initial cellulose concentrations, above 41.4 mM (i.e., 6.7 g liter⁻¹), the increase of lactate production concomitant with the decrease of acetate and (mainly) ethanol biosynthesis showed the clear reorientation of the catabolism. The change was paralleled by an increase in the H₂/CO₂ ratio, which suggested that the intracellular NADH/NAD⁺ ratio was equilibrated through NADH-fd reductase and hydrogenase activities, which may compensate for the decrease of ethanol production (18–20). Moreover, cell dry weight did not increase, and most of the total cellulase activity remained on cellulose fibers. This biomass limitation could not be due to nutritional restriction or inhibitory fermentation metabolites since new cells reinoculated in the same culture were able to grow. The presence of extracellular pyruvate, though, means that the rate of cellulose catabolism exceeded the rate of pyruvate consumption. In this range of cellulose concentrations, as previously observed for cellobiose, these results suggest that the rate of hexose catabolism could exceed the rate of pyruvate consumption via pyruvate-fd oxidoreductase as well as anabolic pathways and may indicate that these enzymes are the rate-limiting step (19, 20). Values of $Y_{X/S}$ and Y_{ATP} were both lower than values obtained with less than 41.4 mM initial cellulose (i.e., 6.7 g liter⁻¹), indicating that an uncoupling growth phenomenon had occurred. Since this decrease also came with pyruvate overflow accompanied by lactate production, growth inhibition was certainly related to an accumulation of an intracellular inhibitory compound(s) due to a deficient regulation of the entering carbon, as suggested by results with cellobiose (18). Even at high cellulose concentrations, however, lower specific rates of product formation and consumption indicated that the metabolism was not deregulated as much as it was on cellobiose (Table 1).

Whatever the initial cellulose concentrations, low soluble sugar concentrations were detected in the supernatant. These results are in agreement with the concept that the depolymerization of insoluble substrate to soluble cellooligosaccharides limits the cellulose fermentation (33). By estimating and comparing q_{hexose} as well as specific rates of product formation to those obtained with cellobiose batch cultures, the present investigation provides further evidence that this concept is well founded. As expected, the entering carbon flow and, as a result, the specific production rates with insoluble cellulose were lower than those with cellobiose, a soluble sugar. In addition, extracellular pyruvate was reconsumed earlier at low initial cellulose concentrations than at higher ones. These data showed that the conversion of insoluble carbohydrate to soluble cello-oligosaccharides was the rate-limiting step in cellulose fermentation, but even so, pyruvate overflow could occur.

The results from the reinoculated culture clearly indicate that the growth arrest observed in classical batch culture was not due to high end product concentrations and was not induced by signal molecules excreted by bacteria at a particular cell density or growth phase (1, 10). The reinoculation process may allow the bypassing of the cell density limitation, a priori, due to self-intoxication of the cell with time, and may then permit the further colonization of available sites on the cellulose fibers and, as a result, an increased cellulose solubilization.

Even if at high carbohydrate concentrations cellulose catab-

olism was similar to that observed on cellobiose in some previously described aspects, it remained clearly different especially at low cellulose concentrations. In accordance with the initial substrate concentrations used, great differences of product concentrations as well as of specific production rates were observed. In cellulose batch fermentations, the cells managed, therefore, to efficiently regulate their metabolism by reorienting the carbon and electron flows. The higher values of specific rates of product formation and consumption obtained in cellobiose batch cultures showed that metabolism was distorted compared to that for a substrate more closely related to the natural ecosystem of the bacterium.

Since the situation of a microorganism under natural conditions is most probably somewhere between the closed batch culture and the open continuous-culture system (24, 25), further investigations with chemostats should allow a better understanding of the *C. cellulolyticum* behavior in its ecological niche with its natural insoluble substrate, the cellulose.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Commission of European Communities FAIR program (contract CT95-0191 [DG 12 SSMA]) and by the Agrice program (contract 9701041).

We thank E. McRae for correcting the English and for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Barrow, P. A., M. A. Lovell, and Z. Barber. 1996. Growth suppression in early stationary-phase nutrient broth cultures of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* is genus specific and not regulated by σ^s . *J. Bacteriol.* **178**: 3072-3076.

2. Bayer, E. A., Y. Shoham, J. Tormo, and R. Lamed. 1996. The cellulosome: a cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose, p. 155-182. *In* M. Fletcher (ed.), *Bacterial adhesion molecular and ecological diversity*. Wiley-Liss, New York, N.Y.

3. Béguin, P., and M. Lemaire. 1996. The cellulosome: an extracellular, multi-protein complex specialized in cellulose degradation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **31**:201-236.

4. Boisset, C., H. Chanzy, B. Henrissat, R. Lamed, Y. Shoham, and E. A. Bayer. 1999. Digestion of crystalline cellulose substrates by the *Clostridium thermocellum* cellulosome: structural and morphological aspects. *Biochem. J.* **340**: 829-835.

5. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

6. Bryant, M. P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**:1324-1328.

7. Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, and J. A. E. Farrow. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:812-826.

8. Dubois, M., K. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* **168**:167.

9. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**:350-356.

10. Dunny, G. M., and B. A. B. Leonard. 1997. Cell-cell communication in Gram positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:527-564.

11. Duong, T. V. C., E. A. Johnson, and A. L. Demain. 1983. Thermophilic, anaerobic and cellulolytic bacteria, p. 156-195. *In* A. Weisman (ed.), *Topics in enzyme and fermentation biotechnology*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.

12. Freier, D., C. P. Mothershed, and J. Wiegel. 1988. Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:204-211.

13. Gelhaye, E., A. Gehin, and H. Petitdemange. 1993. Colonization of crystalline cellulose by *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3154-3156.

14. Gelhaye, E., H. Petitdemange, and R. Gay. 1993. Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose. *J. Bacteriol.* **175**:3452-3458.

15. Giallo, J. 1984. Etude physiologique d'une bactérie cellulolytique mésophile anaérobie: *Clostridium cellulolyticum* (ATCC n° 35319). Ph.D. thesis. Université de Provence, Marseille, France.

16. Giallo, J., C. Gaudin, and J. P. Belaich. 1985. Metabolism and solubilization of cellulose by *Clostridium cellulolyticum* H10. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1216-1221.

17. Giallo, J., C. Gaudin, J. P. Belaich, E. Petitdemange, and F. Caillet-Mangin. 1983. Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic *Clostridium* sp. strain H10. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:843-849.

18. Guedon, E., M. Desvaux, S. Payot, and H. Petitdemange. 1999. Growth inhibition of *Clostridium cellulolyticum* by an inefficiently regulated carbon flow. *Microbiology* **145**:1831-1838.

19. Guedon, E., S. Payot, M. Desvaux, and H. Petitdemange. 1999. Carbon and electron flow in *Clostridium cellulolyticum* grown in chemostat culture on synthetic medium. *J. Bacteriol.* **181**:3262-3269.

20. Guedon, E., S. Payot, M. Desvaux, and H. Petitdemange. 2000. Relationships between cellobiose catabolism, enzyme levels and metabolic intermediates in *Clostridium cellulolyticum* grown in a synthetic medium. *Biotechnol. Bioeng.* **67**:327-335.

21. Huang, L., L. N. Gibbins, and C. W. Forsberg. 1985. Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Clostridium acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1043-1047.

22. Huang, L., and C. W. Forsberg. 1990. Cellulose digestion and cellulase regulation and distribution in *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1221-1228.

23. Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol.* **33**:117-132.

24. Jannash, H. W., and T. Egli. 1993. Microbiol growth kinetics: a historical perspective. *Antonie Leeuwenhoek* **63**:213-224.

25. Kovárová-Kovar, K., and T. Egli. 1998. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:646-666.

26. Kudo, H., K. J. Cheng, and J. W. Costerton. 1987. Electron microscopy study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. *Can. J. Microbiol.* **33**:267-272.

27. Lamed, R. J., J. H. Lobos, and T. M. Su. 1988. Effect of stirring and hydrogen on fermentation products of *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1216-1221.

28. Lapage, S. P., J. E. Shelton, T. G. Mitchell, and A. R. Mackenzie. 1970. Culture collections and the preservation of bacteria. *Methods Microbiol.* **3A**:136-228.

29. Leschine, S. B. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:399-426.

30. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**:426-428.

31. Ng, T., and J. G. Zeikus. 1982. Differential metabolism of cellobiose and glucose by *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. Bacteriol.* **150**:1391-1399.

32. Park, J. T., and M. J. Johnson. 1949. A submicro-determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **181**:149-151.

33. Pavlostathis, S. G., T. L. Miller, and M. J. Wolin. 1988. Fermentation of insoluble cellulose by continuous cultures of *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2655-2659.

34. Payot, S., E. Guedon, C. Cailliez, E. Gelhaye, and H. Petitdemange. 1998. Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth. *Microbiology* **144**:375-384.

35. Pereira, A. N., M. Mobedshashi, and M. R. Ladish. 1988. Preparation of celloedextrins. *Methods Enzymol.* **160**:26-45.

36. Petitdemange, E., F. Caillet, J. Giallo, and C. Gaudin. 1984. *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic mesophilic species from decayed grass. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:155-159.

37. Petitdemange, E., T. Tchunden, S. Valles, H. Pirson, G. Raval, and R. Gay. 1992. Effect of carbon sources on cellulase production by *Clostridium cellulolyticum*. *Biomass Bioenergy* **3**:393-402.

38. Pollack, H. 1984. Biological waste disposal from slaughterhouses, p. 323-330. *In* G. L. Ferrero, M. P. Ferranti, and H. Naveau (ed.), *Anaerobic digestion and carbohydrate hydrolysis of waste*. Elsevier Applied Science Publishers, London, England.

39. Rainey, F. A., and E. Stackebrandt. 1993. 16S rRNA analysis reveals phylogenetic diversity among the polysaccharolytic clostridia. *FEMS Microbiol. Lett.* **113**:125-128.

40. Rainey, F. A., N. L. Ward, H. W. Morgan, R. Toalster, and E. Stackebrandt. 1993. Phylogenetic analysis of anaerobic thermophilic bacteria: aid for their reclassification. *J. Bacteriol.* **175**:4772-4779.

41. Russel, J. B., D. R. Bond, and G. M. Cook. 1996. The fructose diphosphate/phosphate regulation of carbohydrate metabolism in low G+C Gram positive anaerobes. *Res. Microbiol.* **147**:528-534.

42. Schneider, E., and S. Hunke. 1998. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:1-20.

43. Shi, Y., and P. J. Weimer. 1992. Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2583-2591.

44. Strobel, H. J. 1995. Growth of the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum* in continuous culture. *Curr. Microbiol.* **31**:210-214.

45. Strobel, H. J., F. C. Caldwell, and K. A. Dawson. 1995. Carbohydrate trans-

- port by the anaerobic thermophile *Clostridium thermocellum* LQRI. Appl. Environ. Microbiol. **61**:4012-4015.
46. Updegraff, D. M. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. Anal. Biochem. **32**:420-424.
 47. Weimer, P. J., and J. G. Zeikus. 1977. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Appl. Environ. Microbiol. **33**:289-297.
 48. Weimer, P. J., A. D. French, and T. A. Calamari. 1991. Differential fermentation of cellulose allomorphs by ruminal cellulolytic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **57**:3101-3106.
 49. Weimer, P. J., J. M. Lopez-Guisa, and A. D. French. 1990. Effects of cellulose fine structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microorganisms in vitro. Appl. Environ. Microbiol. **56**:2421-2429.
 50. Wells, J. E., and J. B. Russel. 1996. The effect of growth and starvation on the lysis of the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes*. Appl. Environ. Microbiol. **62**:1342-1346.
 51. Willis, A. T. 1969. Techniques for the study of anaerobic spore-forming bacteria. Methods Microbiol. **3B**:80-115.
 52. Wood, T. M., and K. M. Bhat. 1988. Methods for measuring cellulase activities. Methods Enzymol. **160**:87-112.

III. Discussion

Dans cette étude, les conditions de cultures ont été nettement modifiées par rapport à celles décrites précédemment (Giallo *et al.*, 1985) puisque les fermentations sont réalisées dans un bioréacteur sur milieu synthétique et à pH régulé.

Le temps de génération a été amélioré puisqu'il est ici d'environ 12 h contre 24 h d'après Giallo *et al.* (1985), il en va de même pour les performances cellulolytiques puisque avec moins de 6,7 g.l⁻¹ de cellulose initiale 85% de la cellulose sont dégradés en 5 jours seulement. Par ailleurs, aucune modification de la cristallinité du substrat n'a pu être observée au cours de la culture. La diminution de la vitesse d'hydrolyse de la cellulose s'explique plutôt par une modification de la distribution de l'activité cellulasique entre la cellulose et le surnageant de culture.

Avec une concentration initiale en cellulose inférieure à 6,7 g.l⁻¹, la croissance est limitée par le substrat ou plus exactement par les sites d'adhésion accessibles sur les fibres de cellulose. Plus la cellulose est hydrolysée moins les systèmes cellulasiques et les cellules peuvent trouver de nouveaux sites d'adhésion sur la cellulose résiduelle. Ainsi une grande partie de l'activité cellulasique totale se retrouve dans le surnageant en fin de fermentation et ne participe plus à la dégradation du substrat. Dans cette gamme de concentration en cellulose, la cellule produit essentiellement de l'éthanol et de l'acétate dont le rapport augmente continuellement vers 1 avec des concentrations en cellulose initiale croissantes.

Avec des concentrations initiales en cellulose supérieures à 6,7 g.l⁻¹, le pourcentage de dégradation chute. La plus grande part de l'activité cellulasique reste associée à la cellulose et la densité cellulaire maximale plafonne. Dans ces conditions le lactate et l'acétate sont les principaux catabolites finaux de la fermentation et du pyruvate extracellulaire s'accumule dans le surnageant. Bien que certains phénomènes métaboliques observés sur cellobiose puissent être transposés sur cellulose des nuances existent en particulier au niveau des flux métaboliques qui sont globalement plus faibles sur cellulose.

Le suivi des vitesses spécifiques de production montre qu'avec moins de 6,7 g.l⁻¹ de cellulose initiale, le pyruvate excrété dans le surnageant de culture est rapidement reconstitué alors qu'il s'accumule lors de croissances avec plus de 6,7 g.l⁻¹ de cellulose. Par analogie avec l'inhibition de croissance de *Clostridium cellulolyticum* observée en culture discontinue sur cellobiose comme seule source de carbone et d'énergie (Guedon *et al.*, 1999a), l'arrêt de croissance sur cellulose semble également être le résultat d'un flux carboné entrant élevé entraînant l'accumulation de composé(s) intracellulaire(s) inhibiteur(s).

Les expériences de réinoculation de cultures discontinues montrent qu'avec des concentrations en cellulose initiales supérieures à 6,7 g.l⁻¹, la population nouvellement introduite dans la culture est

capable de développer une croissance indépendamment de la population initiale, tant que la surface de la cellulose n'est pas saturée en bactéries. Ceci confirme que même sur cellulose, l'inhibition de croissance est bien un phénomène d'auto-intoxication des cellules.

Malgré le débordement métabolique observé aux concentrations de cellulose supérieures à 6,7 g.l⁻¹, la cellulolyse doit toujours être considérée comme l'étape limitante de la fermentation puisque les valeurs de flux carboné entrant sont nettement inférieures à celles obtenues sur cellobiose en culture discontinue. De plus, la concentration en glucides solubles issus de la cellulolyse reste faible contrairement à ce qui était observé par Giallo *et al.* (1983).

C. L'influence de l'acidification sur la fermentation de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum*

I. Introduction

Par comparaison avec les premières données obtenues sur cellulose (Giallo *et al.*, 1983), les performances cellulolytiques, le temps de génération et la production de métabolites primaires chez *Clostridium cellulolyticum* ont été améliorés lors de l'étude précédente (Desvaux *et al.*, 2000). Ces différences sont probablement liées aux modifications des conditions expérimentales telles que l'utilisation d'un milieu synthétique, la régulation du pH en cours de fermentation, l'agitation continue du milieu de culture ou encore le fait que la culture soit effectuée à pression atmosphérique sans accumulation des gaz issus de la fermentation.

Les premières études de Giallo *et al.* (1983) indiquaient que le pH n'avait aucune influence sur l'inhibition de croissance. Pourtant, toutes les bactéries cellulolytiques anaérobies étudiées jusqu'à présent sont sensibles à la diminution du pH du milieu de culture (Mourino *et al.*, 2001 ; Russell et Dombrowski, 1980 ; Russell et Wilson, 1996) et contrairement à ce qui était avancé par Giallo *et al.* (1983), les différences métaboliques obtenues pourraient être largement imputables à la régulation du pH. Par ailleurs, l'ensemble de ces études a été réalisé sur des glucides solubles censés représenter une croissance sur cellulose.

De fortes concentrations en acides organiques et par conséquent des pH relativement bas sont généralement rencontrés dans les écosystèmes anaérobies de l'environnement (Goodwin et Zeikus, 1987 ; Ljungdahl et Eriksson, 1985). Tandis que l'effet de l'acidification du milieu de culture sur la croissance des bactéries du rumen a été le sujet de nombreuses recherches (Russell et Diez-Gonzalez, 1998 ; Russell et Rychlik, 2001), très peu d'études ont été consacrées au métabolisme des clostridia cellulolytiques dans de telles conditions de culture (Duong *et al.*, 1983 ; Russell *et al.*, 1996 ; Mitchell, 1998).

Par ailleurs, dans son microbiotope naturel, qui est un système ouvert, le métabolisme d'une bactérie se situe vraisemblablement entre un système de culture en continu qui est ouvert et un système de culture discontinue qui est clos. Aussi, l'effet de l'acidification du milieu de culture sur *Clostridium cellulolyticum* sera étudié en utilisant ces deux types de cultures afin de mieux cerner la croissance et le catabolisme de la cellulose dans ces conditions.

II. Résultats

Les résultats de ce travail sont parus dans la revue *Microbiology* dans un article intitulé : "Metabolic flux in cellulose batch and cellulose-fed continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* in response to acidic environment." 2001, 147 : 1461-1471.

Metabolic flux in cellulose batch and cellulose-fed continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* in response to acidic environment

Mickaël Desvaux, Emmanuel Guedon and Henri Petitdemange

Author for correspondence: Henri Petitdemange. Tel: +33 3 83 91 20 53. Fax: +33 3 83 91 25 50.
e-mail: hpetitde@lcb.uhp-nancy.fr

Laboratoire de Biochimie
des Bactéries Gram +,
Domaine Scientifique
Victor Grignard, Université
Henri Poincaré, Faculté des
Sciences, BP 239, 54506
Vandœuvre-lès-Nancy
Cédex, France

***Clostridium cellulolyticum*, a nonruminant cellulolytic mesophilic bacterium, was grown in batch and continuous cultures on cellulose using a chemically defined medium. In batch culture with unregulated pH, less cellulose degradation and higher accumulation of soluble glucides were obtained compared to a culture with the pH controlled at 7.2. The gain in cellulose degradation achieved with pH control was offset by catabolite production rather than soluble sugar accumulation. The pH-controlled condition improved biomass, ethanol and acetate production, whereas maximum lactate and extracellular pyruvate concentrations were lower than in the non-pH-controlled condition. In a cellulose-fed chemostat at constant dilution rate and pH values ranging from 7.4 to 6.2, maximum cell density was obtained at pH 7.0. Environmental acidification chiefly influenced biomass formation, since at pH 6.4 the dry weight of cells was more than fourfold lower compared to that at pH 7.0, whereas the specific rate of cellulose assimilation decreased only from 11.74 to 10.13 milliequivalents of carbon (g cells)⁻¹ h⁻¹. The molar growth yield and the energetic growth yield did not decline as pH was lowered, and an abrupt transition to washout was observed. Decreasing the pH induced a shift from an acetate-ethanol fermentation to a lactate-ethanol fermentation. The acetate/ethanol ratio decreased as the pH declined, reaching close to 1 at pH 6.4. Whatever the pH conditions, lactate dehydrogenase was always greatly in excess. As pH decreased, both the biosynthesis and the catabolic efficiency of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase declined, as indicated by the ratio of the specific enzyme activity to the specific metabolic rate, which fell from 9.8 to 1.8. Thus a change of only 1 pH unit induced considerable metabolic change and ended by washout at around pH 6.2. *C. cellulolyticum* appeared to be similar to rumen cellulolytic bacteria in its sensitivity to acidic conditions. Apparently, the cellulolytic anaerobes studied thus far do not thrive when the pH drops below 6.0, suggesting that they evolved in environments where acid tolerance was not required for successful competition with other microbes.**

Keywords: cellulolytic bacteria, flux analysis, environmental pH, cellulose degradation, chemostat

INTRODUCTION

Biological degradation of cellulosic materials is signifi-

Abbreviations: AADH, acetaldehyde dehydrogenase; AK, acetate kinase; ADH, alcohol dehydrogenase; ATP-Eff, efficiency of ATP generation; Fd, ferredoxin; G1P, glucose 1-phosphate; G6P, glucose 6-phosphate; LDH, lactate dehydrogenase; meq C, milliequivalent of carbon; PFO, pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; PTA, phosphotransacetylase; *R*, ratio of specific enzyme activity to metabolic flux.

cant in swamps, marshes, sediments, composts and anaerobic waste treatment, and in the intestinal tracts of herbivorous animals and insects (Ljungdahl & Eriksson, 1985). Within the biosphere, cellulolytic clostridia participate significantly in this process (Bayer & Lamed, 1992; Leschine, 1995; Tomme *et al.*, 1995), which is strongly linked to the global carbon cycle (Wolin & Miller, 1987).

High concentrations of fermentation acids and, as a

result, low pH conditions are often found in anaerobic habitats (Ljungdahl & Eriksson, 1985; Goodwin & Zeikus, 1987). Yet due to their particular pattern of intracellular pH regulation (Huang *et al.*, 1985) compared with other low-G + C Gram-positive anaerobes, mainly the so-called lactic acid bacteria, the clostridial-type bacteria are generally considered as restricted to less acidic ecological niches (Russell *et al.*, 1996).

Cellulolytic clostridia digest cellulose through extra-cellular multienzyme complexes (Béguin & Lemaire, 1996; Bayer *et al.*, 1998). These cellulosomes are found at the surface of the bacteria and allow both cell adhesion to cellulose fibres (Bayer *et al.*, 1996) and very efficient degradative activity against crystalline cellulose due to a high synergism of the different cellulase components (Boisset *et al.*, 1999).

Clostridium cellulolyticum is a low-G + C Gram-positive nonruminant cellulolytic mesophilic bacterium belonging to the clostridial group III, and also classified in family 4, genus 2, of a new proposed hierarchical structure for clostridia (Collins *et al.*, 1994). Using cellobiose, a soluble substrate, several advances in understanding of the metabolism of this bacterium have been made, such as (i) a better control of catabolism in a mineral salt-based medium (Payot *et al.*, 1998; Guedon *et al.*, 1999b), (ii) recognition of major differences in regulatory responses in cellobiose-limited and cellobiose-saturated chemostat cultures (Guedon *et al.*, 2000b), and (iii) the importance of glucose 6-phosphate (G6P) and glucose 1-phosphate (G1P) nodes in regulation of metabolic fluxes (Guedon *et al.*, 2000a). Earlier investigations using cellulose have been mainly devoted to cellulolytic performance and bacterial behaviour towards insoluble substrates (Giallo *et al.*, 1985; Gelhaye *et al.*, 1993a, b). A few studies, however, have focused on the metabolism of this bacterium on cellulose: recent investigation of cellulose fermentation performed in batch culture (Desvaux *et al.*, 2000) indicated (i) variation of metabolite yields as a function of initial cellulose concentration, and (ii) an early growth inhibition related to pyruvate overflow as with cellobiose (Guedon *et al.*, 1999a). A study in a cellulose-limited chemostat indicated that bacterial metabolism was not as distorted as with cellobiose and *C. cellulolyticum* appeared well adapted to a cellulolytic lifestyle (Desvaux *et al.*, 2001).

Whereas the effects of acidic conditions on the growth of cellulolytic rumen bacteria have been the subject of considerable research (Russell & Dombrowski, 1980; Kalachniuk *et al.*, 1994; Russell & Wilson, 1996; Russell & Diez-Gonzalez, 1998), little is known of how these conditions affect the metabolism of cellulolytic clostridia (Duong *et al.*, 1983; Mitchell, 1998). The aim of the present work was to investigate the cellulose degradation and metabolic changes of *C. cellulolyticum* on insoluble cellulose caused by environmental pH conditions. Since conditions in natural environments most likely resemble those somewhere between a closed batch culture and an open continuous culture system (Kovárová-Kovar & Egli, 1998), both types of culture

systems were used to study the effects of pH on growth and metabolism of *C. cellulolyticum*.

METHODS

Organism and medium. *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 was isolated from decayed grass by Petitdemange *et al.* (1984). Germination of stocks of spores and anaerobic cell culture were performed as described by Desvaux *et al.* (2000). The defined medium used in all experiments was a modified CM3 medium as described by Guedon *et al.* (1999a) containing various amounts of cellulose MN301 (Macherey-Nagel) as specified in Results.

Growth conditions. *Clostridium cellulolyticum* was grown either in batch or in continuous culture with cellulose as sole carbon and energy source. All experiments were performed in a 1.5 l working volume fermenter (LSL Biolafitte) as previously described (Guedon *et al.*, 1999a, b); the temperature was maintained at 34 °C and the pH was controlled by automatic addition of 3 M NaOH or 1 M HCl as specified in Results. The inoculum was 10% (v/v) from an exponentially growing culture.

Batch cultures were prepared as previously described (Desvaux *et al.*, 2000). The chemostat system used was a segmented gas-liquid continuous culture device as described by Weimer *et al.* (1991b) with some modifications (Desvaux *et al.*, 2001). The cultures were maintained for a period of eight to nine residence times (Desvaux *et al.*, 2001); for each condition the data were the mean of at least three samples.

Analytical procedures. Biomass, cellulose concentration, gases, extracellular proteins, amino acids, glucose, soluble cellobioses, glycogen, acetate, ethanol and lactate extracellular pyruvate were assayed as described by Desvaux *et al.* (2001). Pyridine nucleotides, coenzyme A (CoA), acetyl-CoA, G1P and G6P were extracted and fluorimetric determination performed as previously described (Desvaux *et al.*, 2001). ATP and ADP were measured using the luciferin-luciferase luminescence system (Microbial Biomass Test Kit, Celsis Lumac) (Guedon *et al.*, 2000a).

Enzyme assays. Cell extracts were prepared and enzyme assays performed as previously described (Guedon *et al.*, 2000a). Pyruvate-ferredoxin (Fd) oxidoreductase (PFO) (EC 1.2.7.1), lactate dehydrogenase (LDH) (EC 1.1.1.27), phosphotransacetylase (PTA) (EC 2.3.1.8), acetate kinase (AK) (EC 2.7.2.1), acetaldehyde dehydrogenase (AADH) (EC 1.2.1.10) and alcohol dehydrogenase (ADH) (EC 1.1.1.1) were assayed as described by Desvaux *et al.* (2001).

Calculations and carbon flux analysis. The metabolic pathways and equations of cellulose fermentation by *C. cellulolyticum*, expressed as *n* hexose equivalents (hexose eq) corresponding to *n* glucose residues of the cellulose chain, were previously reported (Desvaux *et al.*, 2000).

The $q_{\text{cellulose}}$ is the specific rate of hexose residue fermented in $\text{mmol (g cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$. q_{acetate} , q_{ethanol} and q_{lactate} are the specific rates of product formation in $\text{mmol (g cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$. $q_{\text{extracellular pyruvate}}$ is the specific rate of extracellular pyruvate formation in $\mu\text{mol (g cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$. $q_{\text{NADH produced}}$ and $q_{\text{NADH consumed}}$ are the specific rates of NADH production and NADH consumption respectively in $\text{mmol (g cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ and were calculated as follows: $q_{\text{NADH produced}} = q_{\text{pyruvate}}$ and $q_{\text{NADH consumed}} = 2q_{\text{ethanol}} + q_{\text{lactate}}$. The specific rate of acid production (O'Sullivan & Condon, 1999), was calculated as follows: $q_{\text{H}^+} = q_{\text{acetate}} + q_{\text{lactate}} + q_{\text{extracellular pyruvate}}$.

The molar growth yield ($Y_{x/s}$) is expressed in g cells (mol hexose eq fermented) $^{-1}$. The energetic yield of biomass (Y_{ATP})

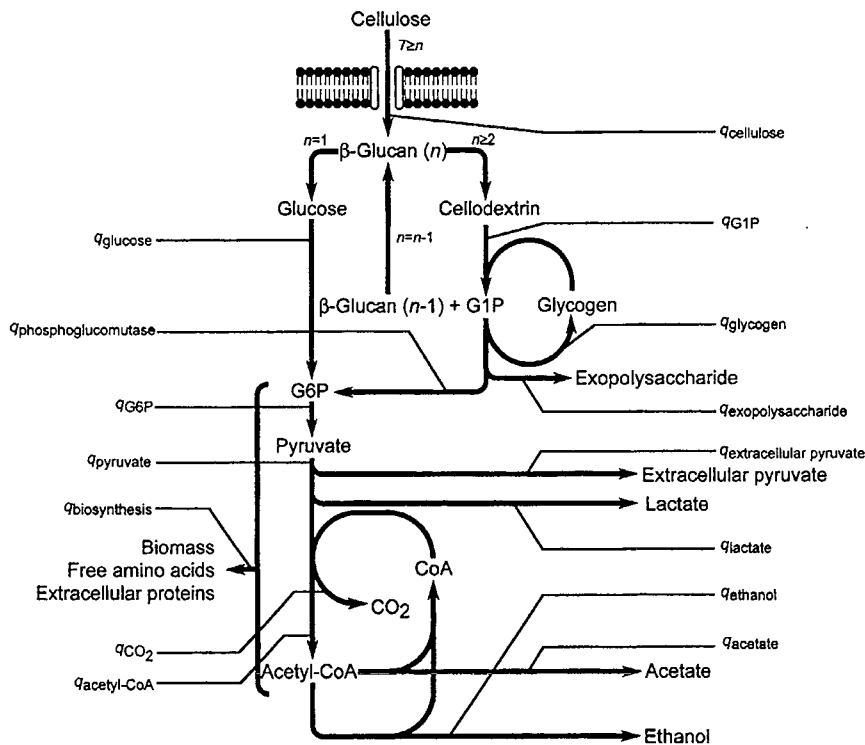


Fig. 1. Carbon flux distribution within the central metabolic pathways of *C. cellulolyticum* when grown on cellulosic substrate (n is the number of hexose residues inside the biopolymer). Carbon flow corresponds to the equations given in Methods.

was (Desvaux *et al.*, 2000): $Y_{ATP} = \text{concn}_{\text{biomass}} / (1.94 \text{ concn}_{\text{acetate}} + 0.94 \text{ concn}_{\text{ethanol}} + 0.94 \text{ concn}_{\text{lactate}} + 0.94 \text{ concn}_{\text{extracellular pyruvate}})$. Y_{ATP} is expressed in g cells (mole ATP produced)⁻¹. q_{ATP} is the specific rate of ATP generation in $\text{mmol (g cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, calculated by the following equation (Desvaux *et al.*, 2000): $q_{ATP} = 1.94 q_{\text{acetate}} + 0.94 q_{\text{ethanol}} + 0.94 q_{\text{lactate}} + 0.94 q_{\text{extracellular pyruvate}}$. The energetic efficiency (ATP-Eff) corresponding to the ATP generation in cellulose catabolism is given by the ratio of q_{ATP} to $q_{cellulose}$ (Miyagi *et al.*, 1994).

Distribution of the carbon flow by stoichiometric flux analysis (Papoutsakis, 1984; Desai *et al.*, 1999a, b) was determined by adapting the model developed by Holms (1996) to *C. cellulolyticum* metabolism (Desvaux *et al.*, 2001).

At steady state, the carbon flux through each enzyme of the known metabolic pathway, as indicated in Fig. 1, was calculated in milliequivalents of carbon ($\text{meq C (g cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$), as follows:

$$q_{G1P} = 0.63 q_{cellulose}$$

$$q_{glucose} = 0.37 q_{cellulose}$$

$$q_{biosynthesis} = q_{\text{biomass}} - q_{\text{glycogen}} + q_{\text{amino acid}} + q_{\text{extracellular protein}}$$

$$q_{G6P} = q_{biosynthesis} + q_{pyruvate}$$

$$q_{phosphoglucomutase} = q_{G6P} - q_{glucose}$$

$$q_{exopolysaccharide} = q_{G1P} - q_{phosphoglucomutase} - q_{glycogen}$$

$$q_{acetyl-CoA} = q_{\text{acetate}} + q_{\text{ethanol}}$$

$$q_{\text{carbon dioxide}} = (q_{\text{acetate}} + q_{\text{ethanol}}) / 2$$

$q_{pyruvate} = q_{\text{acetate}} + q_{\text{ethanol}} + q_{\text{lactate}} + q_{\text{extracellular pyruvate}} + q_{\text{carbon dioxide}}$
The turnover of a pool (h^{-1}) was calculated from specific rate and pool size expressed in moles or in carbon equivalents (Holms, 1996). The ratio R corresponded to the ratio of specific enzyme activity to metabolic flux (Holms, 1996; Desvaux *et al.*, 2001).

RESULTS

Kinetic profile in batch cellulose fermentation

C. cellulolyticum was grown in a bioreactor on defined medium with $6.7 \text{ g cellulose l}^{-1}$ under non-pH-controlled and pH-controlled conditions (Fig. 2). In the non-pH-controlled run, the pH dropped to 5.3 after 6 d culture (Fig. 2Ia). Compared to the batch culture controlled at pH 7.2, the final biomass attained in the non-pH-controlled condition was lower, as was the percentage of cellulose degradation, which reached 67%, as against 86% in the pH-controlled fermentation (Figs 2Ib and 2IIb). The maximum specific growth rate, however, was similar in non-pH-controlled and pH-controlled batch culture, i.e. 0.053 and 0.056 h^{-1} respectively.

The metabolite production profiles were clearly different in the two fermentation modes (Fig. 2Ic and 2IIc). With pH regulation, higher final levels of acetate and ethanol were reached, whereas the lactate and extracellular

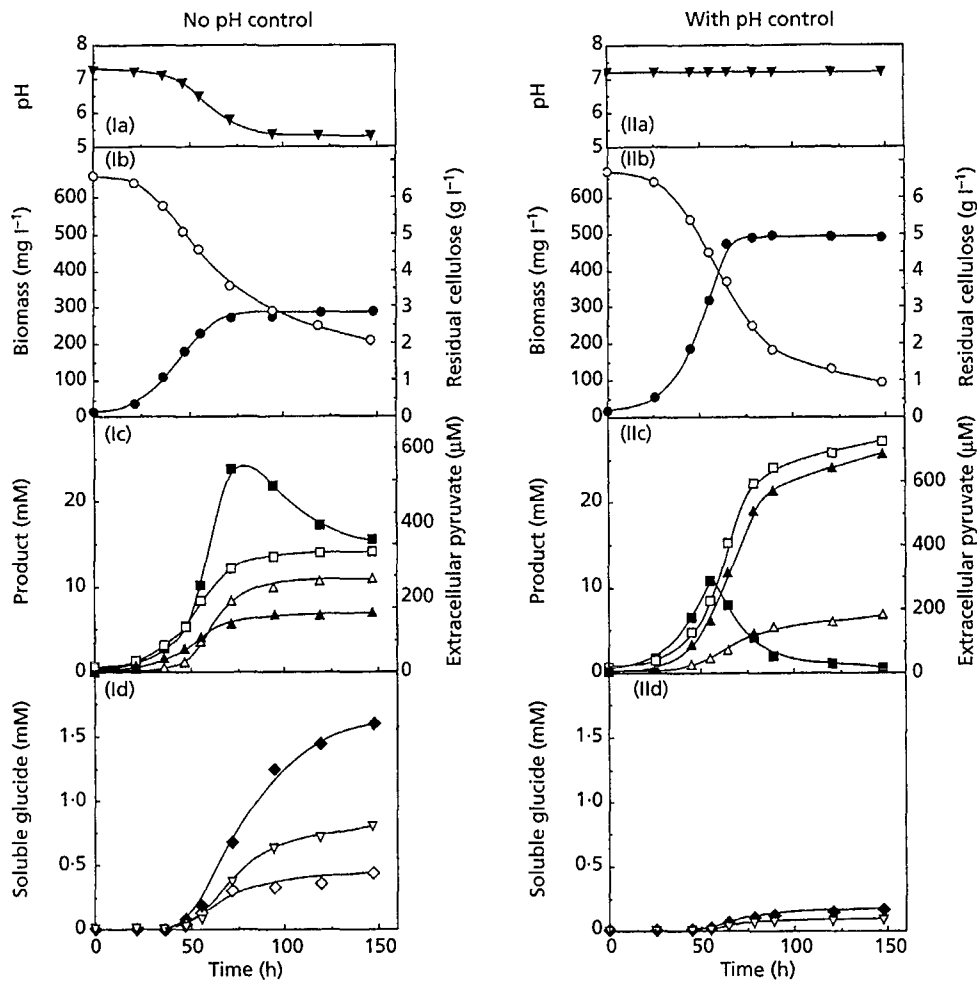


Fig. 2. pH variation (a), growth and residual cellulose concentration (b), metabolite concentrations (c), and soluble glucide accumulation (d) during cellulose batch fermentation without (I) and with (II) pH control. ▼, pH; ○, cellulose; ●, biomass; □, acetate; ▲, ethanol; △, lactate; ■, extracellular pyruvate; ▽, glucose; ◆, cellobiose; ◇, cellotriiose.

pyruvate concentrations attained in the course of fermentation were higher in a non-pH-controlled run. Moreover, with the pH controlled at 7.2, pyruvate was recomsumed in the course of the fermentation more rapidly than without pH control. Thus once growth stopped, biocatabolic activity of cells ceased in the non-pH-controlled culture whereas in the pH-controlled condition the degraded cellulose was further metabolized by resting cells.

The kinetic profile for individual soluble glucide accumulation indicated that it was a non-growth-associated event (Figs 2Id and 2IId). A higher level of soluble cello-oligosaccharides was achieved in fermentation without pH control: up to 1.56 mM cellobiose was detected as well as 0.36 mM cellotriiose. With pH control, the sugar level in the broth medium was very limited since only 0.16 mM cellobiose was found and no cellotriiose could be detected. In both culture conditions,

longer cellodextrins could not be detected either by HPLC or by TLC techniques. Inasmuch as cellulose was degraded to a greater extent in the pH-controlled culture, the difference in accumulation of sugars may reflect a difference in the cellulose substrate, e.g. its surface area (Weimer *et al.*, 1990, 1991a; Fields & Russell, 2000), at the time cultures entered stationary phase, and/or differences in metabolism of stationary-phase cells.

Effect of pH on the growth and metabolite production of *C. cellulolyticum* in cellulose continuous culture

Growth parameters, notably end products measured at each steady state, as a function of the pH value are compiled in Table 1. *C. cellulolyticum* was grown in continuous culture under cellulose-limited conditions and at a constant dilution rate of 0.053 h⁻¹ with pH

Table 1. Fermentation parameters from continuous steady-state cultures of *C. cellulolyticum* as a function of environmental pH at $D = 0.053 \text{ h}^{-1}$

The cellulose input was 0.37% (w/v). Values are the means of samples at steady state and are shown \pm standard deviation where appropriate. Where no standard deviation is given, individual values did not vary from the mean by more than 10%.

| Parameter | Results obtained at pH value of | | | | |
|---|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 7.4 | 7.2 | 7.0 | 6.8 | 6.4 |
| Biomass (g l^{-1}) | 0.129 ± 0.011 | 0.207 ± 0.018 | 0.234 ± 0.021 | 0.164 ± 0.014 | 0.056 ± 0.005 |
| Cellulose consumed (mM hexose eq) | 4.75 ± 0.22 | 7.46 ± 0.38 | 8.14 ± 0.41 | 5.31 ± 0.25 | 1.79 ± 0.09 |
| $q_{\text{cellulose}}$ [$\text{mmol (g cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$] | 1.95 | 1.91 | 1.84 | 1.72 | 1.69 |
| q_{pyruvate} [$\text{mmol (g cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$] | 2.76 | 2.63 | 2.46 | 2.31 | 2.18 |
| Product yield (%)* | | | | | |
| Acetate | 70.3 | 68.11 | 67.2 | 62.3 | 47.7 |
| Ethanol | 29.3 | 30.4 | 30.8 | 33.4 | 44.8 |
| Lactate | 0.5 | 1.5 | 2.0 | 4.4 | 7.5 |
| $q_{\text{extracellular pyruvate}}$ [$\mu\text{mol (g cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$] | 3.91 | 9.47 | 7.29 | 13.90 | 32.42 |
| Glycogen [mg (g cells)^{-1}] | 91.5 ± 2.6 | 96.8 ± 2.9 | 107.3 ± 4.0 | 78.8 ± 2.3 | 62.7 ± 1.7 |
| Extracellular proteins (mg l^{-1}) | 11.3 ± 0.7 | 18.5 ± 0.9 | 18.2 ± 0.8 | 15.4 ± 0.6 | 4.0 ± 0.3 |
| Free amino acids (mg l^{-1}) | 33.4 ± 1.6 | 63.3 ± 3.6 | 62.9 ± 4.0 | 47.1 ± 2.1 | 13.9 ± 0.8 |
| Carbon recovery (%) | 94.7 | 94.2 | 92.3 | 95.3 | 91.4 |

* The product yields were expressed as percentages of q_{pyruvate} .

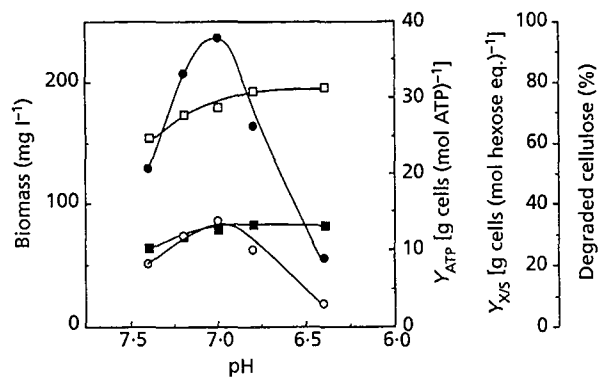


Fig. 3. Dry weight of cells, percentage cellulose degradation, and molar and energetic growth yields during growth of *C. cellulolyticum* in continuous culture ($D = 0.053 \text{ h}^{-1}$) under various pH conditions and with cellulose as sole carbon and energy source. ●, Biomass; ○, percentage cellulose degradation; □, $Y_{X/S}$; ■, Y_{ATP} .

values ranging from 7.4 to 6.4. The primary metabolic end products of the cellulose fermentation were acetate, ethanol, lactate, H_2 and CO_2 . In addition to carbon conversion into biomass, amino acids and extracellular proteins were also detected in the supernatant (Table 1). Exopolysaccharides were readily observable by micro-

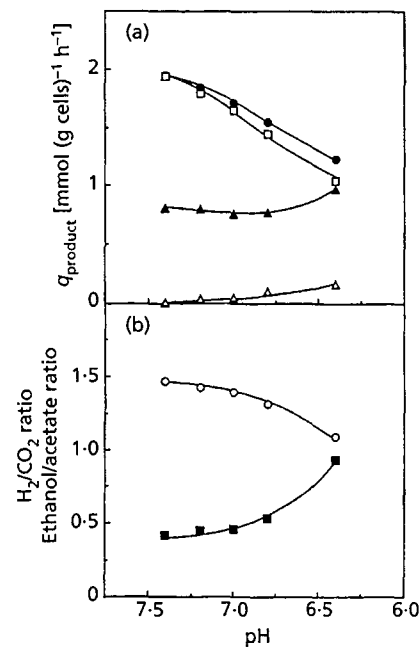


Fig. 4. Specific production rate (a) and product ratio (b) during growth of *C. cellulolyticum* in cellulose-fed continuous culture ($D = 0.053 \text{ h}^{-1}$) under various pH conditions. □, q_{acetate} ; ▲, q_{ethanol} ; △, q_{lactate} ; ●, q_{H_2} ; ○, H_2/CO_2 ; ■, ethanol/acetate ratio.

Table 2. Redox and energetic balance of *C. cellulolyticum* cells at steady state

| Parameter | Results obtained at pH value of | | | | |
|--|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 7.4 | 7.2 | 7.0 | 6.8 | 6.4 |
| NADH [$\mu\text{mol (g cells)}^{-1}$] | 4.75 \pm 0.85 | 4.68 \pm 0.90 | 4.90 \pm 0.97 | 5.26 \pm 1.02 | 5.93 \pm 1.14 |
| NAD ⁺ [$\mu\text{mol (g cells)}^{-1}$] | 11.31 \pm 2.22 | 12.01 \pm 2.36 | 11.40 \pm 2.25 | 11.22 \pm 2.17 | 11.69 \pm 2.33 |
| NADH/NAD ⁺ ratio | 0.42 | 0.39 | 0.43 | 0.47 | 0.51 |
| $q_{\text{NADH produced}}$ [mmol (g cells) ⁻¹ h ⁻¹] | 2.76 | 2.63 | 2.46 | 2.31 | 2.18 |
| $q_{\text{NADH used}}$ [mmol (g cells) ⁻¹ h ⁻¹] | 1.63 | 1.64 | 1.56 | 1.64 | 2.11 |
| $q_{\text{NADH produced}}/q_{\text{NADH used}}$ ratio | 1.69 | 1.61 | 1.57 | 1.41 | 1.03 |
| Pool ATP + ADP [$\mu\text{mol (g cells)}^{-1}$] | 5.13 | 4.79 | 5.39 | 5.92 | 6.11 |
| ATP/ADP ratio | 0.50 | 0.46 | 0.43 | 0.39 | 0.34 |
| q_{ATP} [mmol (g cells) ⁻¹ h ⁻¹] | 4.53 | 4.26 | 3.97 | 3.61 | 3.08 |
| ATP-Eff [*] | 2.32 | 2.23 | 2.15 | 2.10 | 1.82 |

* ATP-Eff is the ATP generation efficiency.

Table 3. Estimation of carbon flow based on the steady-state values from a cellulose chemostat of *C. cellulolyticum* at $D = 0.053 \text{ h}^{-1}$ as a function of environmental pH

Carbon flow was calculated as specified in Methods. See Fig. 1 for the metabolic pathways. The values are expressed both as meq C (g cells)⁻¹ h⁻¹ and, in parentheses, as a percentage of the specific rate of cellulose consumed ($q_{\text{cellulose}}$).

| Carbon flow | Results obtained at pH value of | | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 7.4 | 7.2 | 7.0 | 6.8 | 6.4 |
| $q_{\text{cellulose}}$ | 11.74 (100.0) | 11.46 (100.0) | 11.04 (100.0) | 10.56 (100.0) | 10.13 (100.0) |
| q_{G1P} | 7.39 (63.0) | 7.22 (63.0) | 6.95 (63.0) | 6.65 (63.0) | 6.38 (63.0) |
| q_{glycogen} | 0.18 (1.5) | 0.19 (1.7) | 0.21 (1.9) | 0.16 (1.5) | 0.12 (1.2) |
| $q_{\text{exopolysaccharide}}$ | 0.41 (3.5) | 0.42 (3.7) | 0.60 (5.5) | 0.51 (4.8) | 0.63 (6.2) |
| q_{glucose} | 4.35 (37.0) | 4.24 (37.0) | 4.09 (37.0) | 3.91 (37.0) | 3.75 (37.0) |
| $q_{\text{phosphoglucosutase}}$ | 6.80 (57.9) | 6.60 (57.6) | 6.14 (55.6) | 5.99 (56.7) | 5.63 (55.5) |
| q_{G6P} | 11.15 (94.9) | 10.85 (94.7) | 10.23 (92.6) | 9.90 (93.7) | 9.38 (92.6) |
| $q_{\text{extracellular pyruvate}}$ | 0.01 (0.1) | 0.03 (0.2) | 0.02 (0.2) | 0.04 (0.4) | 0.10 (1.0) |
| $q_{\text{biosynthesis}}$ | 2.84 (24.2) | 2.94 (25.7) | 2.84 (25.7) | 2.92 (27.6) | 2.78 (27.4) |
| q_{pyruvate} | 8.31 (70.7) | 7.90 (69.0) | 7.39 (66.9) | 6.98 (66.1) | 6.60 (65.2) |
| $q_{\text{acetyl-CoA}}$ | 5.50 (46.9) | 5.17 (45.1) | 4.81 (43.6) | 4.43 (41.9) | 4.01 (39.6) |
| q_{lactate} | 0.04 (0.3) | 0.12 (1.0) | 0.15 (1.4) | 0.30 (2.9) | 0.49 (4.8) |
| q_{CO_2} | 2.75 (23.4) | 2.59 (22.6) | 2.41 (21.8) | 2.21 (21.0) | 2.01 (19.8) |
| q_{ethanol} | 1.62 (13.8) | 1.60 (13.9) | 1.51 (13.7) | 1.54 (14.6) | 1.94 (19.2) |
| q_{acetate} | 3.88 (33.1) | 3.58 (31.2) | 3.30 (29.9) | 2.88 (27.3) | 2.07 (20.4) |

scopic examination but could not be measured as previously described (Payot *et al.*, 1998) due to the significant interference with cellulose fibres leading to erroneous estimation of their concentration. Taking into account amino acids, proteins, fermentative end products and biomass concentration, the carbon balance ranged between 91.4 and 95.3% (Table 1).

As the pH was lowered from 7.4 to 7.0, the dry weight of cells increased (Fig. 3); with a further pH decline, however, the cell density decreased and a steady state of the culture could not be established at pH 6.2 since washout occurred. Whatever the pH conditions, *C. cellulolyticum* always left some cellulose undigested

(Fig. 3). When the pH value was decreased from 7.4 to 7.0, the percentage of cellulose degradation increased from 20.6 to 34.2% and then dropped to reach 7.3% at pH 6.4. Whereas *C. cellulolyticum* showed depressed dry weight of cells at pH values higher than 7.0, the observed cell yields ($Y_{X/S}$) did not decline, even at a pH value close to washout (Fig. 3); $Y_{X/S}$ increased from 27.1 to 31.3 g cells (mol ATP)⁻¹ between pH 7.4 and 6.4. The energetic yield of biomass (Y_{ATP}) changed in the same way as $Y_{X/S}$; such a result means that approximately the same amount of ATP was used for the process implicated in cell growth regardless of the pH value.

In all runs, acetate was the main fermentative end

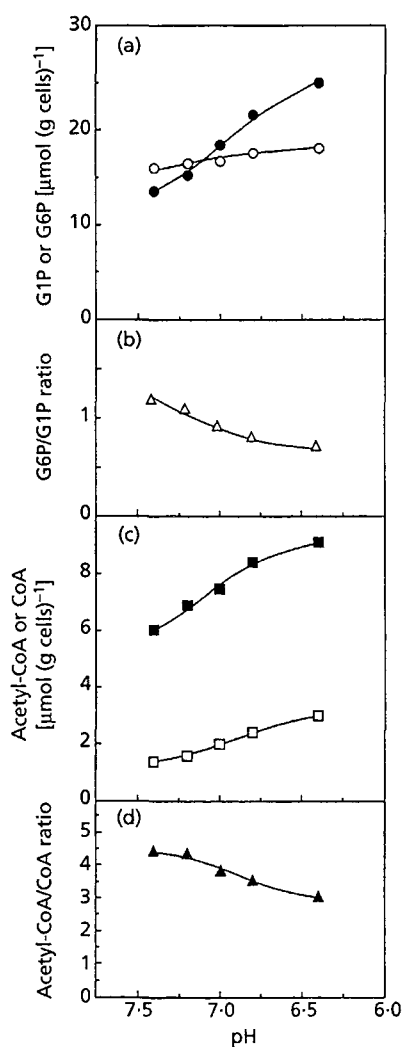


Fig. 5. Effect of pH on the pools (a, c) and ratio (b, d) of G1P and G6P (a, b), and of acetyl-CoA and CoA (c, d), when *C. cellulolyticum* is grown on cellulose in continuous culture at $D = 0.053 \text{ h}^{-1}$. ○, G6P; ●, G1P; △, G6P/G1P; ■, acetyl-CoA; □, CoA; ▲, acetyl-CoA/CoA.

product: it represented between 70.3 and 47.7% of the carbon directed towards catabolites (Table 1). With lowering of pH, the specific production rate of ethanol increased while that of acetate declined, the latter always remaining the higher (Fig. 4a). The ethanol-to-acetate ratio increased with decreasing pH and reached 0.94 at pH 6.4 (Fig. 4b). In contrast, the H_2/CO_2 ratio followed a downward trend with decreasing pH (Fig. 4b). Lactate was also produced at all pH values, but whereas the specific production rate (q_{lactate}) was low at pH 7.4, i.e. $0.01 \text{ mmol (g cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, it increased as the pH decreased, reaching $0.16 \text{ mmol (g cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at pH 6.4 (Fig. 4a). As the pH was lowered, the specific rate of acid end products formed in cellulose chemostat culture

grown at the different pH values, continuously decreased from 1.95 to $1.23 \text{ mmol (g cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 4a).

Redox and energetic balance in a cellulose-fed chemostat at various pH values

The NADH balance calculated from the known metabolic pathways producing and consuming reducing equivalents, i.e. $q_{\text{NADH produced}}/q_{\text{NADH used}}$, continuously decreased with pH from its value of 1.69 at pH 7.4 and was approximately 1 at pH 6.4 (Table 2). Whereas NAD^+ molecules are reduced by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase during ethanol, lactate or acetate formation, only the ethanol and lactate production pathways allow the regeneration of the NAD^+ pool via dehydrogenase activities. Despite the apparent imbalance at pH values higher than 6.4, the intracellular NADH/NAD^+ ratio was always lower than 1 (Table 2). At pH values higher than 6.4, q_{lactate} and q_{ethanol} were then not sufficient to regenerate NADH to NAD^+ . This result correlated with the H_2/CO_2 ratios, which were always higher than 1 (Fig. 4b), suggesting that low lactate and ethanol production was balanced by H_2 gas formation via NADH-Fd reductase and hydrogenase activities.

The stoichiometry of ATP generated over hexose eq fermented (ATP-Eff) decreased from 2.32 to 1.82 as the pH was lowered from 7.4 to 6.4; q_{ATP} also declined, from 4.53 to $3.08 \text{ mmol (g cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Table 2). The ATP + ADP pool fluctuated between 4.79 and $6.11 \text{ μmol (g cells)}^{-1}$, while the ATP/ADP ratio decreased from 0.50 to 0.34 with environmental acidification (Table 2). This variation was probably correlated with the change of the end products, namely the decrease of acetate biosynthesis.

Metabolic flux analysis of cells grown on cellulose in an acid environment

The metabolism of *C. cellulolyticum* when grown on cellulose is depicted in Fig. 1. With acidification of the growth medium from pH 7.4 to 6.4, the rate of cellulose consumption declined from 11.74 to $10.13 \text{ meq C (g cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Table 3). The proportion of the cellulose converted into biomass, free amino acids and extracellular proteins, i.e. $q_{\text{biosynthesis}}$, varied from 24.2 to 27.4% with this pH decline (Table 3); considering each, the biomass formation increased from 17.9 to 20.7% of the original carbon while cellulose conversion into amino acid and extracellular protein accounted for around 5.3 and 1.6% of the carbon uptake respectively. Another part of the carbon flow was directed towards metabolite fermentation, i.e. acetate, ethanol, CO_2 , extracellular pyruvate and lactate, which as a whole decreased from 70.7 to 65.2% of the cellulose consumed (Table 3). Metabolism distributed carbon differently over known catabolic routes as the pH declined. Carbon flow through the CO_2 and acetate formation pathways declined from 23.4 to 19.8% and from 33.1 to 20.4% respectively. However, ethanol formation increased from 13.8 to 19.2% of the carbon consumed; lactate

Table 4. Specific enzymic activity and flux relative to available enzyme activity in *C. cellulolyticum* cell extract at steady state

| Enzyme* | Results obtained at pH value of | | | | | | | | | |
|---------|---------------------------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|------|-------------|------|
| | 7.4 | | 7.2 | | 7.0 | | 6.8 | | 6.4 | |
| | SEA† | R‡ | SEA | R | SEA | R | SEA | R | SEA | R |
| PTA | 0.83 ± 0.08 | 19.1 | 0.97 ± 0.07 | 24.0 | 0.71 ± 0.08 | 19.2 | 0.61 ± 0.05 | 18.8 | 0.46 ± 0.06 | 19.5 |
| AK | 0.88 ± 0.09 | 20.6 | 0.83 ± 0.10 | 20.1 | 0.64 ± 0.06 | 17.2 | 0.49 ± 0.05 | 15.2 | 0.30 ± 0.03 | 12.9 |
| AADH | 0.12 ± 0.01 | 6.3 | 0.18 ± 0.02 | 10.1 | 0.21 ± 0.01 | 12.4 | 0.19 ± 0.01 | 11.3 | 0.22 ± 0.03 | 9.8 |
| ADH | 0.29 ± 0.02 | 15.7 | 0.28 ± 0.03 | 15.6 | 0.25 ± 0.02 | 14.9 | 0.23 ± 0.01 | 13.3 | 0.27 ± 0.03 | 12.3 |
| LDH | 0.15 ± 0.01 | 529.5 | 0.19 ± 0.03 | 215.3 | 0.18 ± 0.01 | 155.4 | 0.14 ± 0.01 | 62.9 | 0.17 ± 0.02 | 46.1 |
| PFO | 0.61 ± 0.05 | 9.8 | 0.66 ± 0.03 | 11.2 | 0.34 ± 0.04 | 6.3 | 0.13 ± 0.02 | 2.5 | 0.08 ± 0.01 | 1.8 |

* PTA, phosphotransacetylase; AK, acetate kinase; AADH, acetaldehyde dehydrogenase; ADH, alcohol dehydrogenase; LDH, L-lactate dehydrogenase; PFO, pyruvate-Fd oxidoreductase.

† SEA is the specific activity of enzyme expressed in $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$.

‡ R is the ratio of specific enzymic activity to metabolic flux through the considered metabolic pathway. Flux was previously expressed as $\mu\text{mol} (\text{mg protein})^{-1} \text{min}^{-1}$.

formation also increased, from only 0.3% at pH 7.4 to 4.8% at pH 6.4. At the same time, the proportion of carbon flowing towards extracellular pyruvate rose from 0.1 to 1% with lower environmental pH.

As the pH decreased, the G6P pool slightly increased (Fig. 5a); in terms of turn-over, this pool varied from 116.4 to 86.5 h^{-1} from pH 7.4 to 6.4. This result was correlated with the concomitant decrease of the carbon flow through glycolysis on the one hand and the increase of the carbon flow through the biosynthesis pathway on the other, as the environmental pH fell. The q_{G6P} decreased from 11.15 to 9.38 $\text{meq C (g cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ with acidification, which represented 94.9–92.6% of the original carbon metabolized (Table 3). As for the G1P pool, it increased with decreasing pH (Fig. 5a) which was expressed as a decrease of the turn-over of this pool from 91.3 to 42.7 h^{-1} from pH 7.4 to 6.4. As a result the G6P/G1P ratio ranged from 1.19 to 0.73 with decreasing environmental pH (Fig. 5b). G1P is an important node in cellulose metabolism since carbon could either flow down glycolysis via phosphoglucosmutase or stored as glycogen, or be converted into exopolysaccharide. $q_{\text{phosphoglucosmutase}}$ decreased from 6.80 to 5.63 $\text{meq C (g cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ with lowering of pH; when expressed as a percentage of $q_{\text{cellulose}}$, this flux ranged from 57.9 to 55.5% (Table 3). The proportion of carbon through q_{glycogen} varied from 1.2 to 1.9%, while $q_{\text{exopolysaccharide}}$ represented 3.5% of the carbon uptake at pH 7.4 to reach 6.2% at pH 6.4 (Table 3).

The CoA pool was fuelled by phosphotransacetylase and acetaldehyde dehydrogenase, whereas acetyl-CoA was formed via pyruvate-Fd oxidoreductase activity (Fig. 1). With lowering of the pH, both pools increased (Fig. 5c), however the acetyl-CoA/CoA ratio decreased from 4.46 to 3.06 (Fig. 5d). Such results were correlated with (i) the rerouting of carbon flow towards biosynthesis, which increased from 24.2 to 27.4% at the

expense of q_{pyruvate} , which decreased from 70.7 to 65.2 $\text{meq C (g cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Table 3) and (ii) the decrease of carbon flowing through acetate production from 33.1 to 20.4% whereas it increased only from 13.8 to 19.2% through the ethanol pathway as pH declined (Table 3).

Enzymic activities as a function of environmental pH

The influence of environmental pH on the specific activities of the enzymes studied is compiled in Table 4. *In vitro*, PFO, PTA, AK and AADH activities were higher under conditions giving higher *in vivo* specific production rates (Table 4). When the carbon flow was expressed as $\mu\text{mol} (\text{mg protein})^{-1} \text{h}^{-1}$ from previously calculated values (Table 3), R (the ratio of the specific enzyme activity to metabolic rate) could be calculated (Holms, 1996). In the metabolic branch leading to acetate production through PTA and AK, R fluctuated between 18.8 and 24.0, and between 20.6 and 12.9, respectively, as pH decreased (Table 4). R for the enzymes of the ethanol pathway varied between 6.3 and 12.4, and between 15.7 and 12.3 for AADH and ADH, respectively (Table 4). At each step in the central metabolic pathways, the intracellular concentration of substrates, products, cofactors or effector molecules as well as intracellular ionic strength, redox potential or pH can influence the partition and regulation of the carbon flux (Holms, 1986). Nevertheless, the fact that fluxes were much less than the available enzyme activity indicated that the carbon flows were determined by the concentration of substrate available rather than the enzyme activity (Holms, 1996). Despite the variation of enzyme biosynthesis, the amount of these enzymes was always sufficient to catabolize the flowing carbon since R was much higher than 1. At pH 7.4, for the lactate formation pathway, R was very high, i.e. 529.5. This indicated that although LDH was readily available, little carbon was catabolized by this metabolic pathway. As

the pH decreased, however, R declined to 46.1, indicating that the LDH was more and more implicated in carbon conversion (Table 4). As for the metabolic route through PFO, R was in the same range as PTA, AK, AADH or ADH for environmental pH values between 7.4 and 7.0, i.e. R between 6.3 and 11.2 (Table 4), indicating that the fluxes were much less than the available enzyme activity. Yet for a pH lower than 7.0, R markedly decreased and reached 1.8 at pH 6.4 (Table 4). Then both biosynthesis and catalytic efficiency of PFO declined with pH since the specific enzyme activity and $q_{\text{acetyl-CoA}}$ decreased (Tables 3 and 4).

DISCUSSION

Contrary to what was first observed by Giallo *et al.* (1983), pH control during batch culture fermentation of *C. cellulolyticum* greatly influenced cell growth and metabolism. In fact, maintaining the pH at 7.2, increased cell density, enhanced ethanol and acetate production and raised the extent of cellulose hydrolysis, but did not increase the amount of soluble glucides formed, contrary to what was observed in non-pH-controlled fermentation. As previously observed with increasing the concentration of cellulose (Desvaux *et al.*, 2000), the maximum rate of cellulose degradation observed in pH-controlled cultivation reflects the higher cell mass compared to a non-pH-controlled culture. Cellulolysis continued after the cessation of growth and a high level of soluble glucide accumulation was only observed in a non-pH-controlled culture. The gain in cellulose degradation achieved under pH control was offset by catabolite production rather than soluble sugar accumulation.

In continuous culture, maximum cell density was obtained at pH 7.0, but as the pH declined from 7.0 to 6.4 at constant D , biomass was lowered more than fourfold. At the same time, the specific rate of cellulose consumption, however, decreased only from 1.84 to 1.69 meq C (g cells)⁻¹ h⁻¹. Thus environmental acidification influenced chiefly the biomass formation rather than cellulose degradation and assimilation. *C. cellulolyticum* did not show depressed yields and the transition to wash-out appeared abrupt. This result would be more consistent with a direct effect on a cellular constituent, such as the negative effect of acid on an enzyme or transport protein (Russell & Dombrowski, 1980; Russell & Diez-Gonzalez, 1998).

During cellulose catabolism by *C. cellulolyticum*, soluble β -glucans are first converted into G1P and G6P (Desvaux *et al.*, 2000). With environmental acidification, the G1P pool increased, since the proportion of carbon flowing via phosphoglucomutase varied between 57.9 and 55.5%. The remaining G1P was directed towards exopolysaccharides (up to 9.9% of the G1P) rather than glycogen synthesis (3.0% maximum of the G1P), both allowing dissipation of carbon surplus (Guedon *et al.*, 2000b). As the culture pH was lowered, the flow through glycolysis decreased while carbon directed to biosynthesis increased; as a result, the G6P pool was between 15.9 and 18.1 μmol (g cells)⁻¹. Compared with

conditions of uncoupling between catabolism and anabolism encountered during ammonium-limited chemostat performed with cellobiose (Guedon *et al.*, 2000a), the excess of carbon at the G1P–G6P branch point was here limited; in fact, exopolysaccharides and glycogen could represent up to 16.0 and 21.4% respectively of the cellobiose consumed and cellotriose was detected extracellularly (Guedon *et al.*, 2000a).

The increase of the acetyl-CoA pool was corroborated by the analysis of carbon flux; the proportion of cellulose consumed flowing through PFO diminished as the pH declined, as did the ratio of specific enzymic activity to metabolic flux (R), and the flux was rerouted away from acetate production. The acetyl-CoA/CoA ratio decrease was paralleled by decreases in H_2/CO_2 and $q_{\text{NADH produced}}/q_{\text{NADH used}}$. Despite the variation of the NADH balance, calculated from catabolic pathways producing and consuming reducing equivalents, the intracellular NADH/NAD⁺ ratio was well regulated. Such a result is in good agreement with the model of Decker *et al.* (1976), where the NADH-Fd reductase is activated by the acetyl-CoA and inhibited by CoA and which underlines that the fates of NADH and acetyl-CoA regulation are intertwined. From acetyl-CoA, acetate was mainly formed but the flux split differently as the environment was acidified, favouring ethanol production. In addition, as pH declined, the level of lactate production rose and coincided with the pyruvate leak, indicating that PFO could no longer support carbon flowing from glycolysis, R decreasing to 1.8 at pH 6.4. Whatever the pH, LDH was always biosynthesized. This enzyme operated mainly as the pH declined but always remained in excess since even at pH 6.4, R was 46.1. In these experimental conditions, LDH allowed draining off part of the pyruvate surplus. At high pH values, H_2/CO_2 ratios higher than 1 suggested that H_2 was produced via NADH-Fd reductase and hydrogenase activities in addition to pyruvate-Fd oxidoreductase and hydrogenase activities. With lower pH values, this ratio decreased and was compensated by the increase of ethanol production until washout occurred.

Reinvestigation of cellulose degradation by *C. cellulolyticum* (Desvaux *et al.*, 2000) showed marked differences in the catabolism of this bacterium as compared with the first investigations carried out (Giallo *et al.*, 1985). The present paper demonstrates that the inhibition of growth first observed with batch culture performed in penicillin flasks sealed with butyl rubber stoppers and without shaking of the medium (Giallo *et al.*, 1983, 1985) is mainly the result of low pH due to acid production in the course of fermentation. The range of pH allowing maximum cell density is restricted; strict control of pH is therefore necessary to obtain the optimum cellulolytic performance in biotechnological processes using *C. cellulolyticum*. Cellulolytic bacteria so far investigated cannot grow at pH values significantly less than 6.0 (Stewart, 1977; Russell & Dombrowski, 1980; Russell & Diez-Gonzalez, 1998). However, it is well established that in anaerobic habitats, particularly in the natural environment, high

fermentation acid concentrations and, as a result, low pH values are often encountered (Ljungdahl & Eriksson, 1985; Goodwin & Zeikus, 1987). Since these bacteria have not developed resistance to low pH environments, this implies that they have evolved in an ecological niche where competition for efficient metabolism in acidic conditions is not crucially important. In the same way that growth of *C. cellulolyticum* under an excess of nutrients (Guedon *et al.*, 1999b) or with an easily available carbon source, such as soluble glucides, appeared as aberrations considering the natural bacterial ecosystem (Desvaux *et al.*, 2000, 2001), cultures without pH control have been shown to be detrimental for optimum growth of this bacterium. These data from monospecies laboratory culture must be extrapolated to microbial ecosystems to explain the maintenance of *C. cellulolyticum* in natural environments. Clearly much remains to be learned about the complex interactions in which this bacterium takes part in microbiota (Kuznetsov *et al.*, 1979; Ljungdahl & Eriksson, 1985; Leschine, 1995; Costerton *et al.*, 1995).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Commission of European Communities FAIR programme (contract no. CT95-0191 [DG 12 SSMA]) and by the programme Agrice (Contract no. 9701041).

The authors thank G. Raval for technical assistance and E. McRae for correcting the English and for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

Bayer, E. A. & Lamed, R. (1992). The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Bio-degradation* 3, 171–188.

Bayer, E. A., Shoham, Y., Tormo, J. & Lamed, R. (1996). The cellulosome: a cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose. In *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*, pp. 155–182. Edited by M. Fletcher. New York: Wiley-Liss.

Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R. & Shoham, Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr Opin Struct Biol* 8, 548–557.

Béguin, P. & Lemaire, M. (1996). The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31, 201–236.

Boisset, C., Chanzy, H., Henrissat, B., Lamed, R., Shoham, Y. & Bayer, E. A. (1999). Digestion of crystalline cellulose substrates by *Clostridium thermocellum* cellulosome: structural and morphological aspects. *Biochem J* 340, 829–835.

Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. & Farrow, J. A. E. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 44, 812–826.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711–745.

Decker, K., Rössle, M. & Kreuzsch, J. (1976). The role of nucleotides in the regulation of the energy metabolism of *Clostridium*

kluyveri. In *Microbial Production and Utilization of Gases*, pp. 75–83. Edited by H. G. Schlegel, G. Gottschalk & N. Pfennig. Göttingen: Akademie der Wissenschaften zu Göttingen.

Desai, R. P., Harris, L. M., Welker, N. E. & Papoutsakis, E. T. (1999a). Metabolic flux analysis elucidates the importance of acid-formation pathways in regulating solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Metab Eng* 1, 206–213.

Desai, R. P., Nielsen, L. K. & Papoutsakis, E. T. (1999b). Metabolic flux analysis elucidates the importance of acid-formation pathways in regulating solvent production by *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *J Biotechnol* 71, 191–205.

Desvaux, M., Guedon, E. & Petitdemange, H. (2000). Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. *Appl Environ Microbiol* 66, 2461–2470.

Desvaux, M., Guedon, E. & Petitdemange, H. (2001). Carbon flux distribution and kinetics of cellulose fermentation in steady-state continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a chemically defined medium. *J Bacteriol* 183, 119–130.

Duong, T. V. C., Johnson, E. A. & Demain, A. L. (1983). Thermophilic, anaerobic and cellulolytic bacteria. In *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, pp. 156–195. Edited by A. Weisman. New York: Wiley.

Fields, M. W. & Russell, J. B. (2000). *Fibrobacter succinogenes* S85 ferments ball-milled cellulose as fast as cellobiose until cellulose surface area is limiting. *Appl Microbiol Biotechnol* 54, 570–574.

Gelhaye, E., Gehin, A. & Petitdemange, H. (1993a). Colonization of crystalline cellulose by *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Appl Environ Microbiol* 59, 3154–3156.

Gelhaye, E., Petitdemange, H. & Gay, R. (1993b). Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose. *J Bacteriol* 175, 3452–3458.

Giallo, J., Gaudin, C., Belaich, J. P., Petitdemange, E. & Caillet-Mangin, F. (1983). Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic *Clostridium* sp. strain H10. *Appl Environ Microbiol* 45, 843–849.

Giallo, J., Gaudin, C. & Belaich, J. P. (1985). Metabolism and solubilization of cellulose by *Clostridium cellulolyticum* H10. *Appl Environ Microbiol* 49, 1216–1221.

Goodwin, S. & Zeikus, J. G. (1987). Ecophysiological adaptations of anaerobic bacteria to low pH: analysis of anaerobic digestion in acidic bog sediments. *Appl Environ Microbiol* 53, 57–64.

Guedon, E., Desvaux, M., Payot, S. & Petitdemange, H. (1999a). Growth inhibition of *Clostridium cellulolyticum* by an inefficiently regulated carbon flow. *Microbiology* 145, 1831–1838.

Guedon, E., Payot, S., Desvaux, M. & Petitdemange, H. (1999b). Carbon and electron flow in *Clostridium cellulolyticum* grown in chemostat culture on synthetic medium. *J Bacteriol* 181, 3262–3269.

Guedon, E., Desvaux, M. & Petitdemange, H. (2000a). Kinetic analysis of *Clostridium cellulolyticum* carbohydrate metabolism: importance of glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate branch points for distribution of carbon fluxes inside and outside cells as revealed by steady-state continuous culture. *J Bacteriol* 182, 2010–2017.

Guedon, E., Payot, S., Desvaux, M. & Petitdemange, H. (2000b). Relationships between cellobiose catabolism, enzyme levels and metabolic intermediates in *Clostridium cellulolyticum* grown in a synthetic medium. *Biotechnol Bioeng* 67, 327–335.

Holms, H. (1986). The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point,

- efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr Top Cell Regul* 28, 69–105.
- Holms, H. (1996). Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 19, 85–116.
- Huang, L., Gibbins, L. N. & Forsberg, C. W. (1985). Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Clostridium acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions. *Appl Environ Microbiol* 50, 1043–1047.
- Kalachniuk, H. I., Marounek, M., Kalachniuk, L. H. & Savka, O. H. (1994). Rumen bacterial metabolism as affected by extracellular redox potential. *Ukr Biokhim Zh* 66, 30–40.
- Kovárová-Kovar, K. & Egli, T. (1998). Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 646–666.
- Kuznetsov, S. I., Dubinina, G. A. & Lapteva, N. A. (1979). Biology of oligotrophic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 33, 377–387.
- Leschine, S. B. (1995). Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu Rev Microbiol* 8, 237–299.
- Ljungdahl, L. G. & Eriksson, K. E. (1985). Ecology of microbial cellulose degradation. *Adv Microb Ecol* 8, 237–299.
- Mitchell, W. J. (1998). Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv Microb Physiol* 39, 31–130.
- Miyagi, A., Ohta, H., Kodama, T., Fukui, K., Kato, K. & Shimono, T. (1994). Metabolic and energetic aspects of the growth response of *Streptococcus rattus* to environmental acidification in anaerobic continuous culture. *Microbiology* 140, 1945–1952.
- Mokrasch, L. C. (1967). Use of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid for the coestimation of amines, amino acids, and proteins in mixtures. *Anal Biochem* 18, 64–71.
- O'Sullivan, E. & Condon, S. (1999). Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H⁺-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 65, 2287–2293.
- Papoutsakis, E. T. (1984). Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. *Biotechnol Bioeng* 26, 174–187.
- Payot, S., Guedon, E., Cailliez, C., Gelhaye, E. & Petitdemange, H. (1998). Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth. *Microbiology* 144, 375–384.
- Petitdemange, E., Caillet, F., Giallo, J. & Gaudin, C. (1984). *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic mesophilic species from decayed grass. *Int J Syst Bacteriol* 34, 155–159.
- Russell, J. B. & Diez-Gonzalez, F. (1998). The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv Microb Physiol* 39, 205–234.
- Russell, J. B. & Dombrowski, D. B. (1980). Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 39, 604–610.
- Russell, J. B. & Wilson, D. B. (1996). Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J Dairy Sci* 79, 1503–1509.
- Russell, J. B., Bond, D. R. & Cook, G. M. (1996). The fructose diphosphate/phosphate regulation of carbohydrate metabolism in low G+C Gram positive anaerobes. *Res Microbiol* 147, 528–534.
- Stewart, C. S. (1977). Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. *Appl Environ Microbiol* 33, 497–502.
- Tomme, P., Warren, R. A. J. & Gilkes, N. R. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microb Physiol* 37, 1–81.
- Weimer, P. J., Lopez-Guisa, J. M. & French, A. D. (1990). Effect of cellulose fine structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Appl Environ Microbiol* 56, 2421–2429.
- Weimer, P. J., French, A. D. & Calamari, T. A. (1991a). Differential fermentation of cellulose allomorphs by ruminal cellulolytic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 57, 3101–3106.
- Weimer, P. J., Shi, Y. & Odt, C. L. (1991b). A segmented gas/liquid delivery system for continuous culture of microorganisms on insoluble substrates and its use for growth of *Ruminococcus flavefaciens* on cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol* 36, 178–183.
- Wolin, M. J. & Miller, T. L. (1987). Bioconversion of organic carbon to CH₄ and CO₂. *Geomicrobiol J* 5, 239–259.

Received 6 November 2000; revised 29 January 2001; accepted 12 February 2001.

III. Discussion

Contrairement à ce qu'avait observé Giallo *et al.* (1983, 1985), le contrôle du pH a une grande influence sur le métabolisme de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum*. Comme pour toutes les bactéries cellulolytiques anaérobies isolées jusqu'à présent (Russell et Wilson, 1996), *Clostridium cellulolyticum* ne peut pas se développer avec des pH significativement inférieurs à 6. Même parmi les bactéries cellulolytiques aérobies, les micro-organismes cellulolytiques acidophiles sont rares, *Acidothermus cellulolyticus* étant la seule bactérie cellulolytique isolée à ce jour pouvant croître dans une gamme de pH inférieurs à 6 (Eppard *et al.*, 1996).

Les cultures discontinues de *Clostridium cellulolyticum* ont montré qu'en maintenant le pH à 7,2, la densité cellulaire, le taux d'hydrolyse de la cellulose et la production d'éthanol et d'acétate sont supérieurs à une culture discontinue sans régulation du pH. Ainsi, la digestion plus importante de la cellulose dans les cultures où le pH est régulé permet un gain de production de catabolites aux dépens des cellodextrines solubles dont les concentrations restent relativement négligeables. Le contrôle du pH a permis d'améliorer la croissance, la production d'acétate et d'éthanol ainsi que la cellulolyse. Ces résultats montrent que les différences observées précédemment étaient en grande partie le résultat d'un pH non contrôlé.

Les cultures continues sur cellulose ont montré que la densité cellulaire maximale est obtenue à pH 7, mais elle diminue très rapidement puisque à pH 6,4 elle est quatre fois plus faible. Parallèlement, la vitesse spécifique de consommation de la cellulose diminue très peu indiquant que l'acidification influence davantage la formation de la biomasse que la dégradation et l'assimilation de la cellulose. L'acétate est toujours le produit majoritaire de la fermentation, mais il représente une part de moins en moins importante du carbone entrant au fur et à mesure que le pH diminue. Quant aux vitesses spécifiques de formation d'éthanol et de lactate, elles augmentent avec l'acidification du milieu. Ainsi, le rendement molaire de croissance ($Y_{X/S}$) augmente continuellement jusqu'à pH 6,4 ce qui semble indiquer que le brusque arrêt de croissance observé à pH 6,2 serait le résultat d'un effet direct sur un constituant cellulaire (Russell et Dombrowski, 1980 ; Russell et Diez-Gonzalez, 1998). L'arrêt de croissance dû à l'inhibition des systèmes cellulases semble exclu puisque la plupart des cellulases ont encore une activité catalytique pour des pH inférieurs à 5 (Russell et Diez-Gonzalez, 1998 ; Wilson, 1992).

Les profils d'évolution des rendements énergétiques (Y_{ATP}) et de croissance ($Y_{X/S}$) en fonction du pH des cultures continues sont très semblables à ceux obtenus pour *Fibrobacter succinogenes* (Russell et Dombrowski, 1980). Chez ce micro-organisme, il a été montré que tandis que le pH extracellulaire chutait, le pH intracellulaire restait constant. Au cours de la fermentation les formes protonées des acides organiques diffusent passivement à travers la membrane plasmique et entraînent l'accumulation de leur forme anionique dans le milieu intracellulaire. Cette accumulation intracellulaire

des espèces anioniques est d'autant plus importante que le gradient de pH est élevé, entraînant par la même occasion l'arrêt des systèmes de transport (Russell et Wilson, 1996). Ce type de régulation intracellulaire du pH serait commun à beaucoup de clostridia (Huang *et al.*, 1985 ; Russell *et al.*, 1996) ; il peut aussi être présent chez certaines bactéries acidophiles mais elles ne sont jamais présentes dans des environnements contenant des concentrations en acides organiques élevées. Les acides organiques n'agissent pas comme des agents découplants synthétiques ; ces derniers sont hautement lipophiles à la fois sous leur forme protonée et déprotonée ce qui abolit le gradient de pH transmembranaire et dissipe la force proton-motrice (Herrero, 1983 ; Herrero *et al.*, 1985 ; Russell, 1992). Chez les autres bactéries cellulolytiques, telles que *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*, le $Y_{x/s}$ diminue progressivement avec l'acidification du milieu de culture jusqu'à l'arrêt de croissance (Russell et Dombrowski, 1980). Chez ces bactéries la diminution du pH extracellulaire est suivie par celle du pH intracellulaire mais la croissance cesse dès que le pH intracellulaire est inférieur à 6. Cette stratégie est une alternative à l'accumulation excessive et à des niveaux toxiques des formes anioniques des acides organiques mais elle nécessite que les enzymes du métabolisme soient adaptées et actives aux pH acides. Ainsi aucune des deux stratégies ne permet aux bactéries cellulolytiques anaérobies jusqu'à présent isolées de résister à la diminution du pH extracellulaire.

D. Etude du catabolisme de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum* en chémostat : influence de la limitation en carbone sur la distribution du flux carboné

I. Introduction

L'utilisation d'un milieu synthétique a fourni des informations importantes sur les mécanismes utilisés par *Clostridium cellulolyticum* pour réguler le catabolisme du cellobiose (Guedon *et al.*, 1999b, 2000b ; Payot *et al.*, 1998).

Par comparaison avec le milieu complexe, l'utilisation d'un milieu synthétique a permis d'augmenter la vitesse spécifique du flux carboné entrant tout en favorisant un meilleur contrôle du flux des électrons par la voie de l'éthanol, de la NADH-Fd oxydoréductase et de l'hydrogénase puisque des valeurs de rapport NADH/NAD⁺ très inférieures à 1 ont été obtenues. Un basculement métabolique d'une fermentation acétate-éthanol vers une fermentation lactate-éthanol est observé lorsque la vitesse spécifique de croissance augmente. L'analyse métabolique des flux a clairement établi un parallélisme entre la vitesse spécifique de consommation du cellobiose et les vitesses spécifiques de formation du lactate et de pyruvate extracellulaire. L'excrétion du pyruvate traduit son accumulation intracellulaire suite à la limitation du flux carboné au niveau de la PFO.

Les cultures en continu utilisant des substrats insolubles, tels que la cellulose, ont été développées assez récemment (Weimer *et al.*, 1991b). En effet, les principales difficultés techniques résidaient dans l'établissement d'un système permettant une alimentation précise, régulière et reproductible en substrat insoluble. Beaucoup d'études ont donc été réalisées en chémostat sur cellulose avec un nutriment limitant autre que la source carbonée ou en employant des systèmes d'alimentation semi-continus. Le développement d'un système de culture continue avec des substrats insolubles rend possible l'étude du catabolisme de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum*. Jusqu'à présent ce système a été utilisé essentiellement pour caractériser la capacité d'hydrolyse de la cellulose par différentes bactéries ou pour étudier les interactions qui peuvent s'établir entre des bactéries cellulolytiques et non cellulolytiques. C'est donc la première fois qu'une culture continue à flux segmenté sur cellulose (Weimer *et al.*, 1991) est utilisée pour l'étude d'un métabolisme bactérien. Après l'étude du métabolisme de *Clostridium cellulolyticum* en culture discontinue sur cellulose (Desvaux *et al.*, 2000), la poursuite de l'étude en cultures continues devrait permettre de mieux caractériser son catabolisme.

II. Résultats

Cette étude fut publiée dans la revue *Journal of Bacteriology* dans un article intitulé : "Carbon flux distribution and kinetics of cellulose fermentation in steady-state continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a chemically defined medium." 2001, 183 : 119-130.

Carbon Flux Distribution and Kinetics of Cellulose Fermentation in Steady-State Continuous Cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a Chemically Defined Medium

MICKAËL DESVAUX, EMMANUEL GUEDON, AND HENRI PETITDEMANGE*

Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +, Domaine Scientifique Victor Grignard, Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex, France

Received 22 May 2000/Accepted 6 October 2000

The metabolic characteristics of *Clostridium cellulolyticum*, a mesophilic cellulolytic nonruminant bacterium, were investigated and characterized kinetically for the fermentation of cellulose by using chemostat culture analysis. Since with *C. cellulolyticum* (i) the ATP/ADP ratio is lower than 1, (ii) the production of lactate at low specific growth rate (μ) is low, and (iii) there is a decrease of the NADH/NAD⁺ ratio and $q_{\text{NADH produced}}/q_{\text{NADH used}}$ ratio as the dilution rate (D) increases in carbon-limited conditions, the chemostats used were cellulose-limited continuously fed cultures. Under all conditions, ethanol and acetate were the main end products of catabolism. There was no shift from an acetate-ethanol fermentation to a lactate-ethanol fermentation as previously observed on cellobiose as μ increased (E. Guedon, S. Payot, M. Desvaux, and H. Petitdemange, *J. Bacteriol.* 181:3262–3269, 1999). The acetate/ethanol ratio was always higher than 1 but decreased with D . On cellulose, glucose 6-phosphate and glucose 1-phosphate are important branch points since the longer the soluble β -glucan uptake is, the more glucose 1-phosphate will be generated. The proportion of carbon flowing toward phosphoglucomutase remained constant (around 59.0%), while the carbon surplus was dissipated through exopolysaccharide and glycogen synthesis. The percentage of carbon metabolized via pyruvate-ferredoxin oxidoreductase decreased with D . Acetyl coenzyme A was mainly directed toward the acetate formation pathway, which represented a minimum of 27.1% of the carbon substrate. Yet the proportion of carbon directed through biosynthesis (i.e., biomass, extracellular proteins, and free amino acids) and ethanol increased with D , reaching 27.3 and 16.8%, respectively, at 0.083 h^{-1} . Lactate and extracellular pyruvate remained low, representing up to 1.5 and 0.2%, respectively, of the original carbon uptake. The true growth yield obtained on cellulose was higher, [50.5 g of cells (mol of hexose eq)⁻¹] than on cellobiose, a soluble cello-dextrin [36.2 g of cells (mol of hexose eq)⁻¹]. The rate of cellulose utilization depended on the solid retention time and was first order, with a rate constant of 0.05 h^{-1} . Compared to cellobiose, substrate hydrolysis by cellulosome when bacteria are grown on cellulose fibers introduces an extra means for regulation of the entering carbon flow. This led to a lower μ , and so metabolism was not as distorted as previously observed with a soluble substrate. From these results, *C. cellulolyticum* appeared well adapted and even restricted to a cellulolytic lifestyle.

Cellulose is of cardinal importance in the global carbon cycle: it accumulates in the environment due to its durable nature (5), and the main final products released during its fermentation are CH₄ and CO₂ (76). Bacteria are the major cellulose hydrolyzers in anaerobic cellulosic microbiota (35, 67), where cellulolytic clostridia play a key role (34).

The cellulose degradation process which occurs through cellulases has been studied extensively on cellulolytic clostridia, leading to the cellulosome concept (4, 6). The multienzymatic complexes found at the surface of the cells are responsible for adhesion of bacteria to cellulose fibers and allow a very efficient synergism of action of the different enzyme components (8). Genes encoding cellulases as well as the mechanism of action of the cellulosome are the subject of considerable research, while few studies have focused on the metabolic aspects of cellulose digestion by clostridia (27, 40).

Recent characterization of the carbohydrate catabolism of

Clostridium cellulolyticum, a nonruminant mesophilic bacterium able to degrade crystalline cellulose, showed that (i) better control of catabolism occurred on a mineral salt-based medium (24, 48), (ii) carbon-limited and carbon-sufficient chemostats displayed major differences in regulatory responses of the carbon flow (25), and (iii) in nitrogen-limited conditions, glucose 6-phosphate (G6P) and glucose 1-phosphate (G1P) branch points play an important role in carbon flux divergence (22). These investigations, however, were performed with cellobiose, which is one of the soluble cello-dextrins released during cellulolysis (56). In such investigations, the use of soluble sugars obviated the bacterial metabolic analysis on cellulose that was assumed difficult to undertake. Metabolic regulation processes found using cellobiose could differ or even be distorted from those with insoluble substrates.

While the first studies of cellulose focused mainly on *C. cellulolyticum* behavior, such as colonization or degradation with an insoluble substrate (19–21), recent investigations of cellulose fermentation in batch culture (12) have indicated that (i) metabolite yields depend strongly on the initial cellulose concentration and (ii) early growth arrest is linked to pyruvate overflow as in cellobiose batch culture (23).

In the last decade, efficient continuous-culture devices for

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +, Domaine Scientifique Victor Grignard, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex, France. Phone: 33 3 83 91 20 53. Fax: 33 3 83 91 25 50. E-mail: hpetitde@lcb.uhp-nancy.fr.

growth on insoluble compounds have been developed (30, 31, 33, 37, 46, 63, 74) and used mainly to estimate the kinetics of cellulose degradation or colonization by various bacteria (1, 43, 58, 59, 71). Continuous culture is also a particularly useful and powerful tool for analyzing the physiology of microorganisms (42, 64).

The aim of this study was to investigate the carbon flow distribution and degradative characteristics of *C. cellulolyticum* when grown in mineral salt-based medium with cellulose, its natural substrate, in chemostat culture.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals were of highest-purity analytical grade. Unless mentioned otherwise, commercial reagents, enzymes, and coenzymes were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. All gases used were purchased from Air Liquide, Paris, France.

Organism and medium. *C. cellulolyticum* ATCC 35319 was originally isolated from decayed grass (52). Stocks of spores, stored at 4°C, were transferred to cellulose medium and heat shocked at 80°C for 10 min (12). Anaerobic cell cultures were subcultured once on cellulose before inoculation and growth in a bioreactor (12, 24). The defined medium used in all experiments was a modified CM3 medium (24) containing 0.37% cellulose MN301 (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Growth conditions. *C. cellulolyticum* was grown on cellulose as the sole carbon and energy source in a mineral salt-based medium. All experiments were performed in a 1.5-liter-working-volume fermentor (LSL Biolafitte, St. Germain en Laye, France). The temperature was maintained at 34°C, and the pH was controlled at 7.2 by automatic addition of 3 N NaOH. Agitation was kept constant at 50 rpm. The inoculum was 10% by volume from an exponentially growing culture. Cells were grown in chemostat at various dilution rates, and each run was independent.

With cellulose, the chemostat system was a segmented gas-liquid continuous culture device as described by Weimer et al. (74). Modifications consisted of (i) sparging the culture medium with sterile oxygen-free N₂; (ii) limiting oxygen entry and maintaining anaerobic culture conditions with connection of low-gas-permeability PharMed, Viton, or glass; (iii) setting up the T-fitting device directly into the feed reservoir to allow partitioning of the slurry into discrete liquid bubbles of N₂ as soon as the medium was pumped, thus avoiding any cellulose sedimentation in the tube connecting the inside and outside of the reservoir of the cellulose-containing medium; (iv) permitting accurate and uniform dispensing of slurry by using cellulose MN301, which does not require any dry sieving prior to use due to its original small particle size (<45 µm). Microbial contamination was monitored regularly by microscopic observation. Achievement of steady-state values for both residual cellulose concentration and biomass required five to six dilutions. The cultures were maintained for an overall period of eight to nine residence times. Culture samples were removed at 6- to 30-h intervals; for each condition, the data were the average from at least three samples collected over 2- to 8-day periods in the steady state of the system.

Analytical procedures. Biomass was estimated by bacterial protein measurement (46) using the Bradford dye method (10) as previously described (12).

Cellulose concentration was determined as described by Huang and Forsberg (29), using a washing procedure (69) and quantification by the phenol-sulfuric acid method (13) as already reported (12).

The relative crystallinity index of the cellulose was determined by the procedure of Shi and Weimer (59).

Hydrogen and carbon dioxide were analyzed on a gas chromatography unit as previously described (24).

Culture supernatants (10,000 × g, 15 min, 4°C) were stored at -80°C until analysis.

Extracellular proteins and amino acids were assayed as previously reported (22-25), using the Bradford dye method (10) and the procedure of Mokrasch (41), respectively.

Glucose was assayed enzymatically, using glucose oxidase and peroxidase with *o*-dianisidine as a chromophore.

Soluble cellooligosaccharides were quantitatively assayed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using refractive index detector and qualitatively using thin-layer chromatography (TLC) as already described (22).

Glycogen determination was performed using amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) according to the procedure of Matheron et al. (38) as previously indicated (22).

Acetate, ethanol, lactate, and succinate were estimated by using the appropriate enzyme kits (Boehringer Mannheim, Meylan, France).

Extracellular pyruvate was assayed enzymatically by fluorometric detection of NADH as previously described (24).

Enzyme assays. Cells were centrifuged (12,000 × g, 15 min, 0°C), and pellets were rapidly frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C. Cells were resuspended in Tris-HCl buffer (50 mM, 2 mM dithiothreitol [DTT] [pH 7.4]) and then sonicated four times for 20 s each with a break of 60 s at a frequency of 20 kilocycles s⁻¹. The supernatant was collected from the cell lysate following centrifugation (12,000 × g, 20 min, 4°C). The protein content of extracts was determined by the method of Bradford (10), using crystalline bovine serum albumin as the standard. Anaerobic conditions were maintained throughout the entire procedure, and all manipulations were performed under oxygen-free nitrogen atmosphere. All enzyme assays were performed at 34°C. Specific activity was determined in a range where linearity with protein concentration was established. For calculation of enzymatic activity, the molar extinction coefficients used for 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), methyl viologen, and NAD(P)H were 13.6 (15), 7.71 (50), and 6.22 mM⁻¹ cm⁻¹ (55), respectively.

The phosphoglucosyltransferase (PGM; EC 5.4.2.2) assay was based on the method of Lowry and Passonneau (36). The reaction mixture contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 1 mM AMP, 1 mM NAD⁺, 2 mM G1P, 3 µM glucose 1,6-diphosphate, and 4 U glucose 6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49).

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; EC 1.2.1.12) activity was determined by the method of Ferdinand (16).

Pyruvate-ferridoxin oxidoreductase (PFO; EC 1.2.7.1) was assayed as described by Meinecke et al. (39). The reaction mixture contained 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2), 0.14 mM sulfhydryl coenzyme A (CoA), 5 mM pyruvate, and 1 mM methyl viologen as the artificial electron acceptor.

Lactate dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) activity was determined as described elsewhere (32) in an assay mixture containing 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.4 mM NADH, 1 mM fructose 1,6 diphosphate, and 20 mM pyruvate.

Phosphotransacetylase (PTA; EC 2.3.1.8) activity was measured as described by Andersch et al. (2).

Acetate kinase (AK; EC 2.7.2.1) activity was determined by coupling hexokinase (EC 2.7.1.1) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) and by following the NADPH-dependent oxidation of G6P to 6-phosphogluconate at 340 nm (32).

Acetaldehyde dehydrogenase (AADH; EC 1.2.1.10) was assayed as described by Dürre et al. (14). The reaction mixture contained 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2), 2 mM DTT, 72 mM semicarbazide, 0.2 mM NADH, and 0.6 mM acetyl-CoA.

The alcohol dehydrogenase (ADH; EC 1.1.1.1) assay was based on the protocol described by Lamed and Zeikus (32). The assay mixture contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.2 mM NADH, 0.2 mM DTT, and 40 mM acetaldehyde.

To determine the K_m of PGM for G1P, a crude extract was dialyzed anaerobically against Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.5) containing 4 mM 2-mercaptoethanol. PGM activity was measured as described above; to determine K_m , the G1P concentrations were varied from 0.02 to 20 mM.

Assay of intracellular compounds. NAD(P)⁺ and NAD(P)H were first rapidly extracted with HCl and KOH, respectively, as described by Wimpenny and Firth (75). Levels of coenzymes were determined by fluorimetric measurements as previously described (24). Other intracellular compounds were extracted from a broth sample by HClO₄, using a rapid extraction system (24).

ATP, ADP, and AMP were measured using a luciferin-luciferase luminescence system (microbial biomass test kit; Celsis Lumac, Landgraaf, The Netherlands) (22).

CoA and acetyl-CoA were measured by coupling appropriate enzyme assays (68) for fluorimetric determination of NADH. The assay mixture contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 1 mM NAD⁺, 0.5 mM EDTA, 1 mM 2-ketoglutarate, and 0.1 U of 2-ketoglutarate dehydrogenase complex from pig heart to initiate CoA consumption. After complete depletion of the CoA in the extract, 2 U of citrate synthase (EC 4.1.3.7) and 4 mM oxaloacetate were added to measure the acetyl-CoA concentration.

Fluorimetric determination of G1P and G6P was based on the PGM assay described above, using glucose 6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) and PGM (EC 5.4.2.2) as previously described (22).

Calculations. The metabolic pathways and equations for cellulose fermentation by *C. cellulolyticum*, expressed as *n* hexose equivalents corresponding to *n* glucose residues of the cellulose chain, were previously reported (12).

$q_{\text{cellulose}}$ is the specific rate of hexose residue fermented in millimoles per gram of cells per hour. q_{acetate} , q_{ethanol} , and q_{lactate} are the specific rates of product

TABLE 1. Calculations for analysis of the carbon flow during cellulose fermentation by *C. cellulolyticum*

| Step ^a | Specific metabolic rate [meq of C (g of cells) ⁻¹ h ⁻¹] | Equation ^b |
|-------------------|--|--|
| 1 | $q_{\text{cellulose}}$ | $(S/X) \times D$ |
| 2 | q_{lactate} | $(C_{\text{lactate}}/X) \times D$ |
| 3 | q_{acetate} | $(C_{\text{acetate}}/X) \times D$ |
| 4 | q_{ethanol} | $(C_{\text{ethanol}}/X) \times D$ |
| 5 | $q_{\text{extracellular pyruvate}}$ | $(C_{\text{extracellular pyruvate}}/X) \times D$ |
| 6 | $q_{\text{biosynthesis from glycolysis}}$ | $[(C_{\text{biomass}} - C_{\text{glycogen}} + C_{\text{amino acid}} + C_{\text{protein}})/X] \times D$ |
| 7 | q_{CO_2} | $[(3) + (4)]/2$ |
| 8 | q_{pyruvate} | $(2) + (3) + (4) + (5) + (7)$ |
| 9 | $q_{\text{acetyl-CoA}}$ | $(3) + (4)$ |
| 10 | q_{G1P} | $(1) \times 0.63$ |
| 11 | $q_{\text{cellulose toward G6P}}$ | $(1) \times 0.37$ |
| 12 | q_{G6P} | $(6) + (8)$ |
| 13 | q_{PGM} | $(12) - (11)$ |
| 14 | q_{glycogen} | $(C_{\text{glycogen}}/X) \times D$ |
| 15 | $q_{\text{exopolysaccharide}}$ | $(10) - (13) - (14)$ |
| 16 | $q_{\text{G1P toward glycogen and exopolysaccharides}}$ | $(14) + (15)$ |

^a Step numbers are diagrammed in Fig. 3.

^b S is the concentration of cellulose consumed, expressed as millequivalents of C per liter; X is the biomass concentration at steady state, expressed as grams per liter; D is the dilution rate; C is millequivalents of C per liter from by-products or biomass.

formation in millimoles per gram of cells per hour. $q_{\text{extracellular pyruvate}}$ is the specific rate of extracellular pyruvate formation in micromoles per gram of cells per hour. q_{pyruvate} is the specific rate of pyruvate used in millimoles per gram of cells per hour, determined as follows: $q_{\text{pyruvate}} = q_{\text{acetate}} + q_{\text{ethanol}} + q_{\text{lactate}} + q_{\text{extracellular pyruvate}}$. $q_{\text{NADH produced}}$ and $q_{\text{NADH consumed}}$, the specific rates of NADH production and NADH consumption, respectively, in millimoles per gram of cells per hour, were calculated as follows: $q_{\text{NADH produced}} = q_{\text{pyruvate}}$ and $q_{\text{NADH consumed}} = 2 q_{\text{ethanol}} + q_{\text{lactate}}$.

The energetic yield of biomass (Y_{ATP}) was calculated as follows: $Y_{\text{ATP}} = \text{concn}_{\text{biomass}} / (1.94 \text{ concn}_{\text{acetate}} + 0.94 \text{ concn}_{\text{ethanol}} + 0.94 \text{ concn}_{\text{lactate}} + 0.94 \text{ concn}_{\text{extracellular pyruvate}})$ (12). Y_{ATP} is expressed in grams of cells per mole of ATP produced. q_{ATP} is the specific rate of ATP generation in millimoles per gram of cells per hour calculated by the following equation: $q_{\text{ATP}} = 1.94 q_{\text{acetate}} + 0.94 q_{\text{ethanol}} + 0.94 q_{\text{lactate}} + 0.94 q_{\text{extracellular pyruvate}}$ (12). The energetic efficiency (ATP-Eff) corresponding to ATP generation in cellulose catabolism is given by the ratio of q_{ATP} to $q_{\text{cellulose}}$.

The energetic charge and oxidation/reduction (O/R) index were calculated according to Gottschalk (26).

The catabolic reduction charge (CRC) and anabolic reduction charge (ARC) were calculated as follows (3): $\text{CRC} = \text{NADH}/(\text{NADH} + \text{NAD}^+)$ and $\text{ARC} = \text{NADPH}/(\text{NADPH} + \text{NADP}^+)$.

The molar growth yield ($Y_{X/S}$) is expressed in grams of cells per mole of hexose equivalents fermented. The Pirt plot was used for determination of maximum yield and maintenance coefficient with the following equation (53): $1/Y = 1/Y^{\text{max}} + m t_R$, where Y^{max} is the true yield (in the absence of maintenance requirements), Y the observed yield, m is the maintenance coefficient, and t_R is the retention time (i.e., $t_R = 1/D$, where D is the dilution rate).

The first-order rate constant of cellulose removal was determined using the model equation (47) $S_R/S_0 = k t_R + x$, where S_R is the concentration of cellulose in the feed reservoir, S_0 is the concentration of cellulose in the culture vessel, k corresponds to the rate constant of cellulose degradation, and x is equal to 1 since it corresponds to the y intercept (i.e., $t_R = 0$ and thus $S_R/S_0 = 1$).

Mapping of the carbon flow. Distribution of the carbon flow was determined by adapting the model developed by Holms (28) to *C. cellulolyticum* metabolism. In the steady state, the flux through each enzyme of the known metabolic pathway was determined as specified in Table 1. Carbon fluxes were expressed in milliequivalents of carbon per gram of cells per hour.

It was assumed that the intracellular β -glucan composed of n hexose residues was catabolized according to the model proposed by Strobel (62) as previously described (12). If $n \geq 2$, then β -glucan (n) + P_i → G1P + β -glucan (n - 1), through cellodextrin and cellobiose phosphorylase. If $n = 1$, then glucose + ATP → G6P + ADP, via glucokinase. As a result, the entering carbon flow directed toward G6P was $\frac{1}{n} q_{\text{cellulose}}$ and that toward G1P was $\frac{(n-1)}{n} q_{\text{cellulose}}$. For example, if $n = 1$ (glucose) for the entering carbohydrate, then the $q_{\text{cellulose}}$ toward G6P is equal to $q_{\text{cellulose}}$ and that toward G1P is nil since no G1P can be formed. If $n = 2$ (cellobiose) for the entering β -glucan, then the $q_{\text{cellulose}}$ toward

G6P is equal to $\frac{1}{2} q_{\text{cellulose}}$ and that toward G1P is $\frac{1}{2} q_{\text{cellulose}}$ since 1 glucose and 1 G1P are formed. If $n = 3$ (cellotriose) for the entering soluble biopolymer, then the $q_{\text{cellulose}}$ toward G6P is equal to $\frac{1}{3} q_{\text{cellulose}}$ and that toward G1P is $\frac{2}{3} q_{\text{cellulose}}$ since 1 glucose and 2 G1P are formed. For soluble β -glucans (n), where $1 \leq n \leq 7$ (12, 51), average carbon flows directed toward G6P of 0.37 $q_{\text{cellulose}}$ and toward G1P of 0.63 $q_{\text{cellulose}}$ were calculated.

The turnover of a pool per hour was calculated from the specific rate and pool size expressed in moles or in carbon equivalents (22). It corresponded to the rate of input or output divided by the pool size, which is then the number of times the pool turns over every hour.

R corresponded to the ratio of specific enzyme activity to metabolic flux (28). Like specific enzyme activity, metabolic flux was expressed in micromoles per milligram of protein per minute from carbon flow calculated as described above.

Statistics. Statistical analysis of the data was performed following analysis of variance and Student t test (9) with Excel.

RESULTS

Cellulose digestion and biomass formation. Preliminary results in chemostats indicated that with between 2 and 6 g of cellulose liter⁻¹ and at a dilution rate of 0.025 h⁻¹, biomass formation increased proportionately to cellulose concentration (data not shown). *C. cellulolyticum* was then grown with 3.7 g of cellulose liter⁻¹ at different steady-state combinations of D—equal to the microbial specific growth rate (μ)—which ranged from 0.014 to 0.083 h⁻¹ (Table 2); steady-state growth on cellulose was attained neither at $D < 0.01$ h⁻¹ nor at $D > 0.09$ h⁻¹ since washout then occurred. The latter value corroborated the maximum growth rate (μ_{max}) of 0.087 h⁻¹ (i.e., a generation time of 8 h) estimated by following growth with the rate of tritiated thymidine incorporation into DNA during the exponential phase of batch growth on cellulose (20). Cell density was maximum at low D, i.e., 0.207 g liter⁻¹ at 0.014 h⁻¹, but slowly decreased with increasing D to reach 0.154 g liter⁻¹ at 0.083 h⁻¹ (Table 2). In all of the runs, microscopic examinations of the cultures revealed that almost all of the cellulose fibers were colonized by bacteria; the few particles that were not were most likely those that had been recently introduced into the bioreactor (74). Unattached cells were mostly observable under conditions of low D.

TABLE 2. Fermentation parameters from continuous steady-state cultures^a of *C. cellulolyticum*

| Parameter | Results obtained at D (h^{-1}) of ^b : | | | | | | | |
|--|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 0.014 | 0.027 | 0.035 | 0.041 | 0.055 | 0.064 | 0.076 | 0.083 |
| Biomass (g liter^{-1}) | 0.207 ± 0.019 | 0.212 ± 0.018 | 0.204 ± 0.014 | 0.199 ± 0.012 | 0.196 ± 0.015 | 0.185 ± 0.013 | 0.172 ± 0.011 | 0.154 ± 0.009 |
| Consumed cellulose (mmol of hexose eq) | 17.59 ± 0.85 | 12.29 ± 0.59 | 10.06 ± 0.52 | 8.81 ± 0.45 | 6.98 ± 0.33 | 6.18 ± 0.31 | 5.21 ± 0.25 | 4.70 ± 0.23 |
| $q_{\text{cellulose}}$ [mmol (g of cells) ⁻¹ h ⁻¹] | 1.19 | 1.57 | 1.73 | 1.82 | 1.96 | 2.14 | 2.30 | 2.53 |
| q_{pyruvate} [mmol (g of cells) ⁻¹ h ⁻¹] | 1.94 | 2.49 | 2.62 | 2.74 | 2.84 | 2.96 | 3.15 | 3.39 |
| Product yield (%) of q_{pyruvate} | | | | | | | | |
| Acetate | 72.9 | 71.0 | 69.5 | 67.8 | 66.4 | 65.4 | 64.1 | 60.8 |
| Ethanol | 24.9 | 26.9 | 28.8 | 30.4 | 32.0 | 33.1 | 34.5 | 37.6 |
| Lactate | 1.9 | 1.8 | 1.5 | 1.6 | 1.4 | 1.4 | 1.3 | 1.3 |
| $q_{\text{extracellular pyruvate}}$ [μmol (g of cells) ⁻¹ h ⁻¹] | 5.97 | 6.24 | 6.87 | 7.84 | 7.32 | 5.16 | 4.27 | 12.06 |
| Glycogen [mg (g of cells) ⁻¹] | 58.8 ± 1.9 | 95.2 ± 2.8 | 108.7 ± 4.1 | 105.2 ± 3.8 | 99.5 ± 3.7 | 91.8 ± 3.4 | 84.5 ± 2.5 | 79.4 ± 2.1 |
| Extracellular proteins (mg liter ⁻¹) | 54.3 ± 2.7 | 44.8 ± 1.8 | 32.3 ± 1.6 | 19.4 ± 0.9 | 18.5 ± 0.8 | 17.4 ± 1.1 | 10.3 ± 0.7 | 13.8 ± 0.5 |
| Free amino acids (mg liter ⁻¹) | 138.9 ± 7.1 | 95.5 ± 4.9 | 88.1 ± 4.7 | 76.8 ± 4.1 | 63.2 ± 3.5 | 59.5 ± 3.7 | 48.4 ± 3.1 | 38.4 ± 2.2 |
| $Y_{\text{X/S}}$ [g of cells (mol of hexose eq) ⁻¹] | 11.8 | 17.3 | 20.3 | 22.6 | 28.1 | 29.9 | 33.0 | 32.8 |
| Carbon recovery (%) | 96.5 | 98.3 | 97.1 | 97.6 | 98.8 | 97.2 | 97.7 | 95.8 |

^a The cellulose input was 0.37% (wt/vol), and ammonium was added at 15.13 mM.

^b Where indicated, values are averages of samples at steady-state ± standard deviations. All other values were determined with an average accuracy of ±10%.

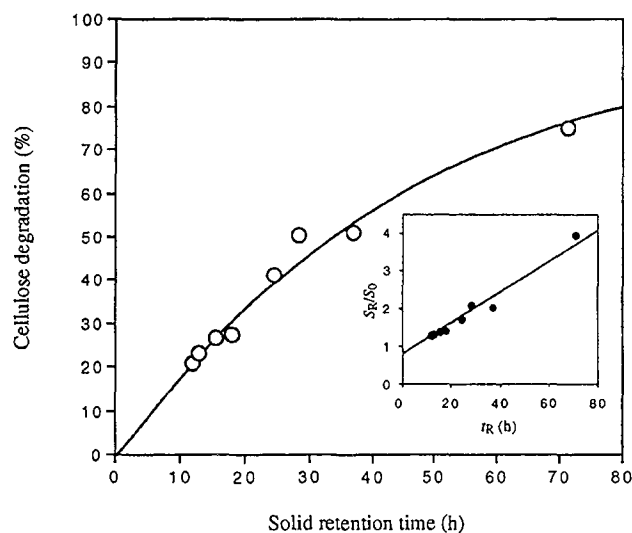


FIG. 1. Effect of solid t_R on cellulose digestion by *C. cellulolyticum*. Inset, correlation between S_R/S_0 and t_R .

In continuous culture at 3.7 g of cellulose liter⁻¹, *C. cellulolyticum* always left some undigested cellulose (Fig. 1). The longer was the solid retention time ($t_R = 1/D$), the higher was the percentage of cellulose degradation: from 0.014 h⁻¹ (i.e., $t_R = 71.4$ h) to 0.083 h⁻¹ (i.e., $t_R = 12.0$ h), the percentages of digested cellulose at steady state were 75.0 and 20.9, respectively (Fig. 1). Regardless of D , glucose or cellodextrins could not be detected in the supernatant using enzymatic, HPLC, and TLC techniques, and so cellulose hydrolysis did not yield a significant pool of soluble sugars. Crystallinity measurements showed that the relative crystallinity index of cellulose in chemostat at 0.014 h⁻¹ was 88.8, compared to 89.6 for the original cellulose MN301. Thus, even at long t_R , the residual cellulose was not enriched in its crystalline content during the fermentation. Plots of S_R/S_0 versus t_R were linear, and so cellulose digestion follows first-order kinetics where linear regression of the data ($r^2 = 0.976$) gives a first-order rate constant for cellulose removal of 0.05 h⁻¹ (Fig. 1).

The observed cell yields increased with increasing D and varied from 11.8 to 32.8 g of cells per mol of hexose eq consumed (Table 2). From the observed growth yield, which is affected by microbial endogenous metabolism and maintenance energy requirements, the true growth yield was calculated. A Pirt plot ($r^2 = 0.987$) allowed determining the maintenance coefficient and $Y_{\text{X/S}}^{\text{max}}$, which were estimated at 0.9 mmol of hexose eq/g of cells/h and 50.5 g of biomass/mol of hexose eq consumed, respectively.

Metabolite production. Acetate, ethanol, lactate, H₂, and CO₂ were the primary metabolic end products, and no succinate accumulation was observed (Table 2). The percentage of carbon flow toward fermentative metabolites, given by the ratio $q_{\text{pyruvate}}/q_{\text{cellulose}}$, indicated that 67.0 to 81.5% of the consumed cellulose was converted to extracellular pyruvate, lactate, CO₂, acetate, and ethanol. The remaining carbon flow was oriented toward amino acid, protein, biomass, and exopolysaccharide formation. Exopolysaccharides could not be measured as previously described (48) because of significant inter-

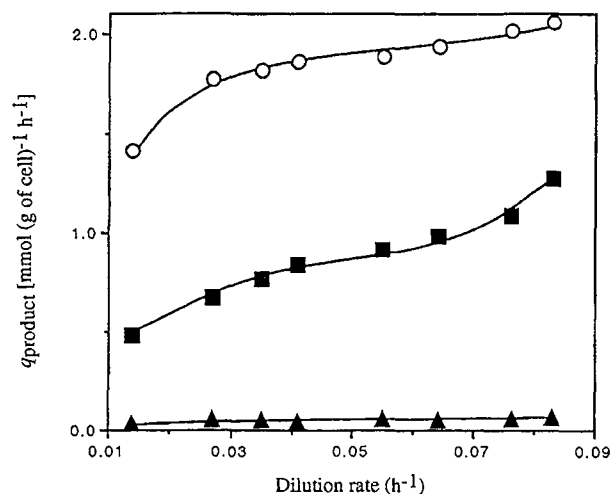


FIG. 2. Influence of D on q_{acetate} (○), q_{ethanol} (■), and q_{lactate} (▲).

ference with cellulose fibers leading to erroneous estimation of their concentrations, but they were readily observable by microscopic examination. The carbon balance, calculated by taking into account amino acids, proteins, fermentative end products, and biomass, was then in a range between 95.8 and 98.7%.

q_{acetate} and q_{ethanol} increased 1.5- and 2.6-fold, respectively, with D (Fig. 2). Acetate production represented up to 72.9% of the carbon flowing toward catabolites (Table 2) and remained the higher specific production rate (Fig. 2). Levels of lactic acid and extracellular pyruvate formed were lower, reaching maxima of only 0.04 mmol (g of cells)⁻¹ h⁻¹ and 12.06 μmol (g of cells)⁻¹ h⁻¹, respectively (Fig. 2). Thus, the majority of the carbon flow was for acetate and ethanol production, with a progressive shift toward ethanol production with increasing D .

Fermentation balance. Formulation of a reducing equivalent balance equation requires a fair knowledge of the biochemistry of carbon assimilation for a particular substrate (44, 45). The reactions leading to the formation of catabolites during the fermentation of cellulose by *C. cellulolyticum* were previously described (12). Cellulose hydrolysis liberates soluble sugars, which are then metabolized by bacteria and allow cell growth. The hexose residues of a β-1,4 polymer of glucose have a mean formula of $C_6H_{10n+2}O_{5n+1}$, where n represents the degree of polymerization, i.e., the number of glucose residues inside the

biopolymer. From cellulose degradation, it was assumed that soluble cellodextrins with a degree of polymerization n between 1 and 7 could potentially be incorporated and fermented by the cells (12, 51, 56). This corresponds to an average formula of hexose equivalents from glucose to celloheptaose utilized by bacteria of $C_{6.0}H_{10.7}O_{5.4}$.

The synthesis of biomass—with an elemental composition of $C_4H_7NO_2$ (24)—from cellulose digestion can be represented by the overall scheme $C_{6.0}H_{10.7}O_{5.4} + 1.5 NH_3 \rightarrow 1.5 C_4H_7NO_2 + 2.4 H_2O$. Since no available hydrogen atoms were used to equilibrate the equation, this meant that when bacteria grow on cellulose, reducing equivalents NAD(P)H are well balanced by biomass synthesis. It was assumed that CO₂ production through general decarboxylation enzymes and CO₂ fixation in biomass gave a balance of almost nil (24, 44, 45).

Energetic and redox balance. The stoichiometry of ATP generated over hexose equivalents fermented, i.e., ATP-Eff, was higher at low D since it was 2.72 and declined to 2.07 with the highest D value (Table 3) due to the decrease of the percentage of acetate production (Table 2). As D increased, q_{ATP} rose from 3.24 to 5.25 mmol (g of cells)⁻¹ h⁻¹ (Table 3). The apparent energetic yield increased with increasing D as well (Table 3). The low Y_{ATP} obtained at low μ reflected an expenditure of energy due to the more pronounced maintenance requirement at low μ . The Pirt plot ($r^2 = 0.984$) permitted determining a true energetic yield ($Y_{\text{ATP}}^{\text{max}}$) of 30.3 g of cells (mol of ATP)⁻¹ and a maintenance energy (m_{ATP}) estimated at 2.9 mmol of ATP (g of cells)⁻¹ h⁻¹.

Whatever the μ , the pool of ATP and ADP rose while AMP remained quite constant at ca. 0.10 μmol (g of cells)⁻¹. The ratio ATP/ADP fluctuated between 0.37 and 0.46, while a mean value of 0.63 was obtained for the adenylate energy charge.

From the known catabolic pathways which produced and consumed reducing equivalents, the coenzyme balance could be calculated. $q_{\text{NADH produced}}$ increased with increasing D , from 1.94 to 3.39 mmol (g of cells)⁻¹ h⁻¹, as did $q_{\text{NADH used}}$, which ranged from 0.99 to 2.59 mmol (g of cells)⁻¹ h⁻¹ (Table 4). $q_{\text{NADH produced}}/q_{\text{NADH used}}$, however, ranged from 1.96 to 1.31, indicating an excess of NADH since the ratio was always greater than 1. Despite this imbalance, the intracellular ratio NADH/NAD⁺ was always lower than 1 and the CRC was constant at around 0.27 (Table 4). This result correlated with H₂/CO₂ ratios which were always higher than 1. These data suggested that the regeneration of NADH to NAD⁺ was due to the NADH-ferredoxin (NADH-fd) reductase and hydroge-

TABLE 3. Adenylate content and energetic balance of *C. cellulolyticum* cells at steady state

| Parameter | Results obtained at D (h ⁻¹) of ^a : | | | | | | | |
|---|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0.014 | 0.027 | 0.035 | 0.041 | 0.055 | 0.064 | 0.076 | 0.083 |
| Pool ATP + ADP [μmol (g of cells) ⁻¹] | 4.41 | 4.55 | 5.18 | 5.83 | 5.42 | 6.05 | 5.98 | 6.91 |
| ATP/ADP ratio | 0.37 | 0.45 | 0.40 | 0.35 | 0.39 | 0.36 | 0.44 | 0.46 |
| AMP [μmol (g of cells) ⁻¹] | 0.10 ± 0.02 | 0.05 ± 0.01 | 0.09 ± 0.02 | 0.14 ± 0.03 | 0.12 ± 0.02 | 0.07 ± 0.01 | 0.11 ± 0.01 | 0.08 ± 0.02 |
| Energetic charge | 0.62 | 0.65 | 0.63 | 0.61 | 0.63 | 0.62 | 0.64 | 0.65 |
| q_{ATP} [mmol (g of cells) ⁻¹ h ⁻¹] | 3.24 | 4.11 | 4.29 | 4.44 | 4.56 | 4.72 | 4.98 | 5.25 |
| ATP-Eff | 2.72 | 2.62 | 2.48 | 2.44 | 2.33 | 2.21 | 2.16 | 2.07 |
| Y_{ATP} [g of cells (mol of ATP) ⁻¹] | 4.3 | 6.6 | 8.2 | 9.2 | 12.1 | 13.6 | 15.3 | 15.8 |

^a See Table 2, footnote b.

TABLE 4. Pyridine nucleotide content and redox balance for continuous steady-state cultures of *C. cellulolyticum*

| Parameter | Results obtained at D (h^{-1}) of: | | | | | | | |
|--|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 0.014 | 0.027 | 0.035 | 0.041 | 0.055 | 0.064 | 0.076 | 0.083 |
| NADH [$\mu\text{mol (g of cells)}^{-1}$] | 3.39 ± 0.68 | 4.44 ± 0.89 | 4.65 ± 0.91 | 4.79 ± 0.95 | 4.83 ± 0.98 | 5.32 ± 1.07 | 5.68 ± 1.12 | 6.11 ± 1.19 |
| NAD ⁺ [$\mu\text{mol (g of cells)}^{-1}$] | 8.44 ± 1.73 | 10.05 ± 2.03 | 12.08 ± 2.41 | 13.11 ± 2.64 | 15.74 ± 2.78 | 16.16 ± 3.23 | 16.53 ± 3.32 | 19.45 ± 3.91 |
| NADPH [$\mu\text{mol (g of cells)}^{-1}$] | 7.47 ± 1.68 | 8.04 ± 1.89 | 5.89 ± 1.19 | 5.65 ± 1.13 | 4.74 ± 0.94 | 4.43 ± 0.89 | 3.82 ± 0.87 | 4.26 ± 0.95 |
| NADP ⁺ [$\mu\text{mol (g of cells)}^{-1}$] | 0.11 ± 0.03 | 0.08 ± 0.02 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| ARC | 0.29 | 0.31 | 0.28 | 0.27 | 0.23 | 0.25 | 0.26 | 0.24 |
| ARC | 0.99 | 0.99 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| $q_{\text{NADH produced}}$ [$\text{mmol (g of cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$] | 1.94 | 2.49 | 2.62 | 2.74 | 2.84 | 2.96 | 3.15 | 3.39 |
| $q_{\text{NADH used}}$ [$\text{mmol (g of cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$] | 0.99 | 1.38 | 1.55 | 1.71 | 1.86 | 1.99 | 2.21 | 2.59 |
| $q_{\text{NADH tel}}$ [$\text{mmol (g of cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$] | 0.94 | 1.11 | 1.07 | 1.03 | 0.98 | 0.96 | 0.94 | 0.80 |
| H_2/CO_2 ratio | 1.65 | 1.56 | 1.58 | 1.51 | 1.38 | 1.41 | 1.35 | 1.29 |
| O/R index | 0.93 | 0.95 | 0.92 | 0.94 | 0.99 | 0.96 | 0.98 | 0.97 |

^a See Table 2, footnote b. ND, not detectable.

nase activities, explaining the production of additional H_2 and the intracellular NADH/NAD⁺ ratio lower than 1 (Table 4). Taking into account the gas production ratio, the O/R index was determined as very close to 1, indicating an efficient regulating system for the reoxidation of NADH via hydrogen production in addition to carbon fermentative pathways (23, 24).

Concerning the phosphopyridine nucleotides involved in biosynthesis pathways, the reduced form was in excess since the NADP⁺ pool was hardly detectable (Table 4). As a result, the ARC was constant and equal to 1.00, meaning that NADPH was largely available for biosynthesis reaction.

Kinetic analysis of cellulose fermentation. The effects of D on cellulose consumption and product formation are summarized in Fig. 3. The rate of cellulose consumption varied from 7.14 to 15.20 meq of C ($\text{g of cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ with increasing D .

Carbon conversion to biomass, extracellular proteins, and free amino acids increased from 1.03 to 4.14 meq of C ($\text{g of cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Fig. 3) and reached 27.3% of the original carbon uptake at $D = 0.083 \text{ h}^{-1}$. Most of the carbon used for these biosyntheses, however, was converted to biomass since regardless of D , both extracellular proteins and free amino acids represented a constant proportion of the original carbon, around 7.5%.

The cellulose catabolism leading to pyruvate from which fermentation end products were formed—i.e., acetate, CO_2 , extracellular pyruvate, ethanol, and lactate—increased from 5.82 to 10.18 meq of C ($\text{g of cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Fig. 3), yet the percentage of the entering carbon used for the end product formation decreased from 81.5 to 67.0% with increasing growth rate. q_{acetate} and q_{ethanol} increased from 2.83 to 4.12 and from 0.97 to 2.55 meq of C ($\text{g of cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectively. However, when expressed as a percentage of $q_{\text{cellulose}}$, the flux through the acetate pathway decreased from 39.6 to 27.1%, while through the ethanol production route this percentage rose from 13.5 to 16.8. q_{lactate} increased only from 0.11 to 0.13 meq of C ($\text{g of cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ and represented a small portion of the carbon uptake since it dropped from 1.5 to 0.9%. The specific rate of extracellular pyruvate formation ranged from 0.02 to 0.04 mmol ($\text{g of cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$, and this leak toward the outside of the cells bottomed out at 0.2% of the carbon uptake.

Another part of the entering carbon flow was directed toward exopolysaccharide synthesis (Fig. 3), which increased from 0.25 to 0.63 meq of C ($\text{g of cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ and represented up to 4.2% of the specific consumption rate of cellulose.

Intracellular pool of hexose phosphate and CoA derivative.

The G6P pool was fueled by the carbon flow from glucokinase activity and by PGM activity from the G1P pool (Fig. 3). At this metabolic node, the G6P pool decreased with increasing growth rate (Table 5), indicating that the turnover of the pool increased and actually reached 212.3 h^{-1} at $\mu = 0.083 \text{ h}^{-1}$ (Fig. 3). This variation was correlated with the increase of the carbon flow through glycolysis and biosynthesis metabolic pathways with higher μ . The q_{G6P} increased from 6.86 to 14.32 meq of C ($\text{g of cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ with higher D (Fig. 3); whatever the D , it represented a mean of 96.0% of the carbon uptake. The G1P pool rose from 5.71 to 20.12 $\mu\text{mol (g of cells)}^{-1}$ with D (Table 5) and thus corresponded to a decrease in the turnover of the pool (Fig. 3). As a result, the G6P/G1P ratio ranged from 6.48 to 0.56 with increasing μ (Table 5).

TABLE 5. Intracellular metabolite levels of continuous steady-state cultures of *C. cellulolyticum*

| Parameter | Results obtained at D (h^{-1}) of ^a : | | | | | | | |
|---|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 0.014 | 0.027 | 0.035 | 0.041 | 0.055 | 0.064 | 0.076 | 0.083 |
| G6P ^a [μmol (g of cells) ⁻¹] | 36.98 ± 1.14 | 35.76 ± 0.92 | 29.98 ± 0.79 | 26.31 ± 0.73 | 16.64 ± 0.58 | 14.28 ± 0.51 | 11.29 ± 0.62 | 11.24 ± 0.55 |
| G1P ^b [μmol (g of cells) ⁻¹] | 5.71 ± 0.33 | 8.01 ± 0.40 | 9.65 ± 0.32 | 10.99 ± 0.54 | 14.16 ± 0.61 | 15.96 ± 0.57 | 18.23 ± 0.75 | 20.12 ± 0.68 |
| G6P/G1P ratio | 6.48 | 4.46 | 3.11 | 2.39 | 1.18 | 0.89 | 0.62 | 0.56 |
| Acetyl-CoA [μmol (g of cells) ⁻¹] | 2.51 ± 0.18 | 2.98 ± 0.21 | 3.56 ± 0.23 | 3.81 ± 0.25 | 5.75 ± 0.39 | 6.27 ± 0.42 | 7.06 ± 0.46 | 8.37 ± 0.56 |
| CoA ^c [μmol (g of cells) ⁻¹] | 0.48 ± 0.03 | 0.59 ± 0.04 | 0.74 ± 0.06 | 0.87 ± 0.05 | 1.29 ± 0.09 | 1.54 ± 0.11 | 2.12 ± 0.14 | 2.86 ± 0.19 |
| Acetyl-CoA/CoA ratio | 5.23 | 5.05 | 4.81 | 4.38 | 4.46 | 4.07 | 3.33 | 2.93 |

^a See Table 2, footnote *b*.

From the G1P junction, the carbon could be either stored as glycogen or converted to exopolysaccharide, or it could be directed more toward glycolysis via PGM (Fig. 3). Whatever the D , no cellotriose could be detected and G1P was metabolized as exopolysaccharides. With increasing D , the carbon flow via PGM increased from 4.21 to 8.70 meq of C (g of cells)⁻¹ h⁻¹, and the percentage of the original carbon flowing through this metabolic pathway remained quite constant, ranging from 59.0 to 57.2%. q_{glycogen} increased from 0.03 to 0.24 meq of C (g of cells)⁻¹ h⁻¹ and represented up to 1.6% of the entering carbon flow. The turnover of the glycogen pool remained low since it increased from 0.02 to 0.09 times per hour with the highest D value and was correlated with increasing q_{pyruvate} and $q_{\text{biosynthesis}}$.

The pool of CoA was formed from phosphotransacetylase and acetaldehyde dehydrogenase, and that of acetyl-CoA was formed from PFO activity (Fig. 3). At this branch point, the pools increased with μ and the acetyl-CoA/CoA ratio decreased slightly, from 5.23 to 2.93 (Table 5). The specific metabolic rate of acetyl-CoA ranged from 3.79 to 6.67 meq of C (g of cells)⁻¹ h⁻¹, while its turnover decreased from 755.9 to 398.5 times per hour. These facts are associated with (i) reorientation of the carbon fluxing through $q_{\text{biosynthesis}}$, increasing from 14.5 to 27.3%, at the expense of q_{pyruvate} , decreasing from 81.5 to 67.0%; and (ii) decrease of the percentage of carbon flow through the acetate pathway, which was reoriented toward ethanol in different proportions since carbon conversion to acetate dropped from 39.6 to 27.1%, while it increased only from 13.6 to 16.8% through the ethanol pathway.

Enzymatic activities. The effects of μ on specific activities of the enzymes are compiled in Table 6. In vitro enzyme activities

were higher under conditions giving higher in vivo specific production rates. The level of GAPDH rose continuously with increasing carbon flow, indicating efficient hexose catabolism during glycolysis; from the lowest to the highest D , the GAPDH level increased 3.3-fold. From 0.014 to 0.083 h⁻¹, PFO increased 1.7-fold, PTA increased 1.4-fold, AK increased 7.1-fold, AADH increased 3.2-fold, and ADH increased 2.9-fold.

When the flux was expressed as micromoles per milligram per hour of protein from previously calculated values (Fig. 3), the ratio R (specific enzyme activity in biomass/metabolic flux) could be calculated (28). For metabolic pathways leading to acetate production via PTA and AK, R varied between 22.1 and 23.9 and from 6.9 to 33.6, respectively; with PFO, R was ca. 10.2. Similarly, R for enzymes of the ethanol pathway ranged from 5.4 to 10.6 and from 14.9 to 18.5 for AADH and ADH, respectively. However, with the metabolic route through PGM, this ratio was constant at only ca. 1.2. This indicated that flux via PGM utilized all of the available activity of the enzyme. The specific activity of PGM increased 2.1-fold from lowest to highest D (Table 6) and was thus correlated with higher specific metabolic rates. These results mean that the enzyme regulates activity in the cell to balance the flux from G1P to G6P whatever the μ . An apparent K_m of 0.21 mM for G1P catalyzed by PGM was calculated from an Eadie-Hofstee plot (17) (data not shown). By assuming an internal volume of 1.67 ml (g of cells)⁻¹ (24), the steady-state internal G1P concentration was calculated as 3.42 to 12.05 mM (Table 5); these data suggest that the PGM reaction was zero-order kinetics with respect to catalyzed substrate, which is in good agreement with the analysis of metabolic flux. In contrast, the ratio R for the lactate

TABLE 6. Specific enzymatic activity and flux relative to available enzyme activity in *C. cellulolyticum* cell extract at steady-state growth^a

| Enzyme ^a | Results obtained at D (h^{-1}) of ^a : | | | | | | | |
|---------------------|--|-------|--|-------|--|-------|--|-------|
| | 0.014 | | 0.035 | | 0.064 | | 0.083 | |
| | Mean SEA [$\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg of protein) ⁻¹] ± SD | R | Mean SEA [$\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg of protein) ⁻¹] ± SD | R | Mean SEA [$\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg of protein) ⁻¹] ± SD | R | Mean SEA [$\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg of protein) ⁻¹] ± SD | R |
| GAPDH (EC 1.2.1.12) | 1.13 ± 0.19 | | 2.37 ± 0.28 | | 2.82 ± 0.31 | | 3.81 ± 0.45 | |
| PGM (EC 5.4.2.2) | 0.021 ± 0.006 | 1.3 | 0.028 ± 0.008 | 1.2 | 0.035 ± 0.013 | 1.1 | 0.044 ± 0.011 | 1.3 |
| LDH (EC 1.1.1.27) | 0.13 ± 0.01 | 150.6 | 0.26 ± 0.03 | 298.3 | 0.38 ± 0.04 | 402.9 | 0.43 ± 0.05 | 434.2 |
| PFO (EC 1.2.7.1) | 0.44 ± 0.04 | 10.2 | 0.57 ± 0.06 | 9.8 | 0.71 ± 0.07 | 10.9 | 0.74 ± 0.09 | 9.8 |
| PTA (EC 2.3.1.8) | 0.76 ± 0.08 | 23.9 | 0.95 ± 0.01 | 23.2 | 0.99 ± 0.13 | 22.8 | 1.03 ± 0.14 | 22.1 |
| AK (EC 2.7.2.1) | 0.22 ± 0.03 | 6.9 | 0.46 ± 0.04 | 11.3 | 1.11 ± 0.15 | 25.5 | 1.56 ± 0.21 | 33.6 |
| AADH (EC 1.2.1.10) | 0.09 ± 0.01 | 7.9 | 0.09 ± 0.02 | 5.4 | 0.24 ± 0.02 | 10.6 | 0.29 ± 0.03 | 10.2 |
| ADH (EC 1.1.1.1) | 0.17 ± 0.02 | 15.2 | 0.25 ± 0.03 | 14.9 | 0.41 ± 0.04 | 18.5 | 0.49 ± 0.06 | 17.2 |

^a SEA, specific activity of enzyme; R , ratio of specific enzymatic activity to metabolic flux through the metabolic pathway (see Results).

formation pathway was always very high, ranging from 150.6 to 434.2. This indicates that the enzyme concentration increases as catabolic carbon flow increases but was not correlated with a proportional rise of the specific production rate of lactate; LDH increased 3.5-fold, from 0.014 to 0.083 h⁻¹ (Table 6), while q_{lactate} varied only slightly (Fig. 3).

DISCUSSION

Based on microscopic observations, cellulose fibers were found to be covered by the microbial cell; such continuous cultures are generally regarded as cellulose limited (59, 71, 74). Yet cells which adhere to cellulose can also be considered to be in substrate-sufficient conditions. In fact, soluble sugars liberated from cellulose are the real substrate for growth and are incorporated by cells as rapidly as they are formed, since no glucose or cellobioses could be detected in the supernatant. It may therefore be possible that bacteria display a metabolism under or near carbon-sufficient conditions and not carbon-limited conditions as previously suggested by microscopic examination. In cellobiose-sufficient conditions, the ATP/ADP ratios were as high as 7.21 and always higher than 1 (25), while in cellobiose limitation the ATP/ADP ratios ranged between 0.21 and 0.69 (E. Guedon, M. Desvaux, and H. Petitdemange, unpublished data). In the cellulose chemostat cultures carried out, the ATP/ADP ratios ranged from 0.37 to 0.46 and were always lower than 1 as in carbon-limited chemostats. In cellobiose limitation, few lactate molecules were produced at low D , contrary to what was observed in cellobiose-sufficient continuous culture (25). Moreover, on cellulose continuous culture, the ratios NADH/NAD^+ and $q_{\text{NADH produced}}/q_{\text{NADH used}}$ dropped as D increased, while in cellobiose-sufficient conditions these ratios rose (25). All of these results lead to the conclusion that the cellulose continuous cultures described here were performed under carbon limitation; it can thus be maintained that the chemostats were cellulose-limited continuous cultures.

In such conditions, the cellulose catabolism of *C. cellulolyticum* led to an acetate-ethanol fermentation maximizing ATP production. Concerning the distribution of the fluxes throughout the metabolic network, at least 94.2% of the carbon flow was used for generation of energy and biosynthetic precursors; the remaining carbon was converted to glycogen and exopolysaccharides. The proportion of carbon flowing through G6P remained quite constant regardless of D but differed between $q_{\text{biosynthesis}}$ and q_{pyruvate} as μ increased; more of the carbon uptake was directed toward biosynthesis pathways at high D values than at lower ones. Regardless of D , extracellular proteins and free amino acids represented around 7.5% of the entering carbon. The carbon flow was always directed mainly toward acetate production, which represented a minimum of 27.1% of the original carbon at the highest μ . Yet the carbon from glycolysis directed through biosynthesis and ethanol in-

creased to 27.3 and 16.8%, respectively, at $D = 0.083 \text{ h}^{-1}$. Theoretical calculation suggest on the one hand that with *Trichoderma reesei* used as a model, optimal growth of a cellulolytic anaerobe requires major allocation of ATP toward cellulase biosynthesis (70) and on the other hand that with low ATP production per mole of hexose equivalent, most of the carbon source is used for the generation of energy (57). From lowest to highest D , *C. cellulolyticum* diverted 7.8 to 21.6% of the cellulose to cell carbon, whereas 81.3 to 66.7% was used for ATP production.

On cellulose, G6P-G1P was an important branch point since the longer the soluble β -glucan uptake period is, the more G1P will be generated. The ratio of PGM specific activity to q_{PGM} (close to 1) reflected the precision of the control exerted by this enzyme on the partition of the flux at this junction (28), where the conversion of G1P to G6P feeds further the Embden-Meyerhof pathway. A high R indicates that the fluxes are determined by the concentration of substrate available in the pool rather than the enzyme activity (28). However, intracellular concentrations of substrates, products, cofactors, or effector molecules as well as intracellular ionic strength, redox potential, or pH could influence the partition and regulation of flux at each step in the central metabolic pathways (28). In vitro enzyme assays could then differ from in vivo conditions, and the significance of a low R could be more difficult to establish. Control of the PGM pathway by the amount of PGM was reinforced by the finding that K_m was more than 10-fold lower than the lowest intracellular G1P concentration determined. With higher D , the flow through glycolysis and biosynthesis increased, as did G6P turnover. The G1P pool, however, increased because the proportion of carbon flowing via PGM did not vary as much. G1P was thus directed toward exopolysaccharide formation, which reached a maximum of 4.2% of the original carbon uptake. The proportion of the flow through glycogen synthesis increased as well and represented up to 1.6% of the entering carbon flow. Here, glycogen turnover increased with D but remained low (maximum of 0.09 h^{-1}), while the glycogen pool increased up to $108.7 \text{ mg (g of cells)}^{-1}$ at 0.035 h^{-1} and then slowly decreased; glycogen biosynthesis could be adjusted as a function of the carbon flow. At the G1P-G6P branch point, the flux partitioning was then stabilized via PGM while the carbon surplus was dissipated by exopolysaccharide and intracellular glycogen synthesis. In fact, the percentage of G1P converted to G6P via PGM remained constant at around 93.7%, whereas the proportion of G1P converted to glycogen increased from 0.7 to 2.6% between $D = 0.014$ and 0.083 h^{-1} . In the same time, exopolysaccharide represented around 5.3% of the G1P produced. These productions seem to buffer the increasing carbon flow from G1P, which could not be metabolized via PGM. On cellulose-limited chemostat cultures, carbon excess at this branch point was limited compared to ammonium-limited chemostat culture performed on cellobiose (which corresponded to an uncou-

FIG. 3. Distribution of carbon flux within the central metabolic pathways based on steady-state kinetics from continuous cultures of *C. cellulolyticum* grown on cellulose at $D = 0.014, 0.035, 0.064,$ and 0.083 h^{-1} . Carbon flow (\rightarrow) and turnover (\leftrightarrow) were calculated as specified in Materials and Methods and according to the values in Tables 1 and 2. Fluxes through metabolic pathways are expressed as millequivalents of C per gram of cells per hour and are indicated by thin lines where numbers in parentheses refer to step numbers in Table 1. Turnover per hour is indicated by a thin line connected to a box with a rolling circle symbolizing the turnover of the pool.

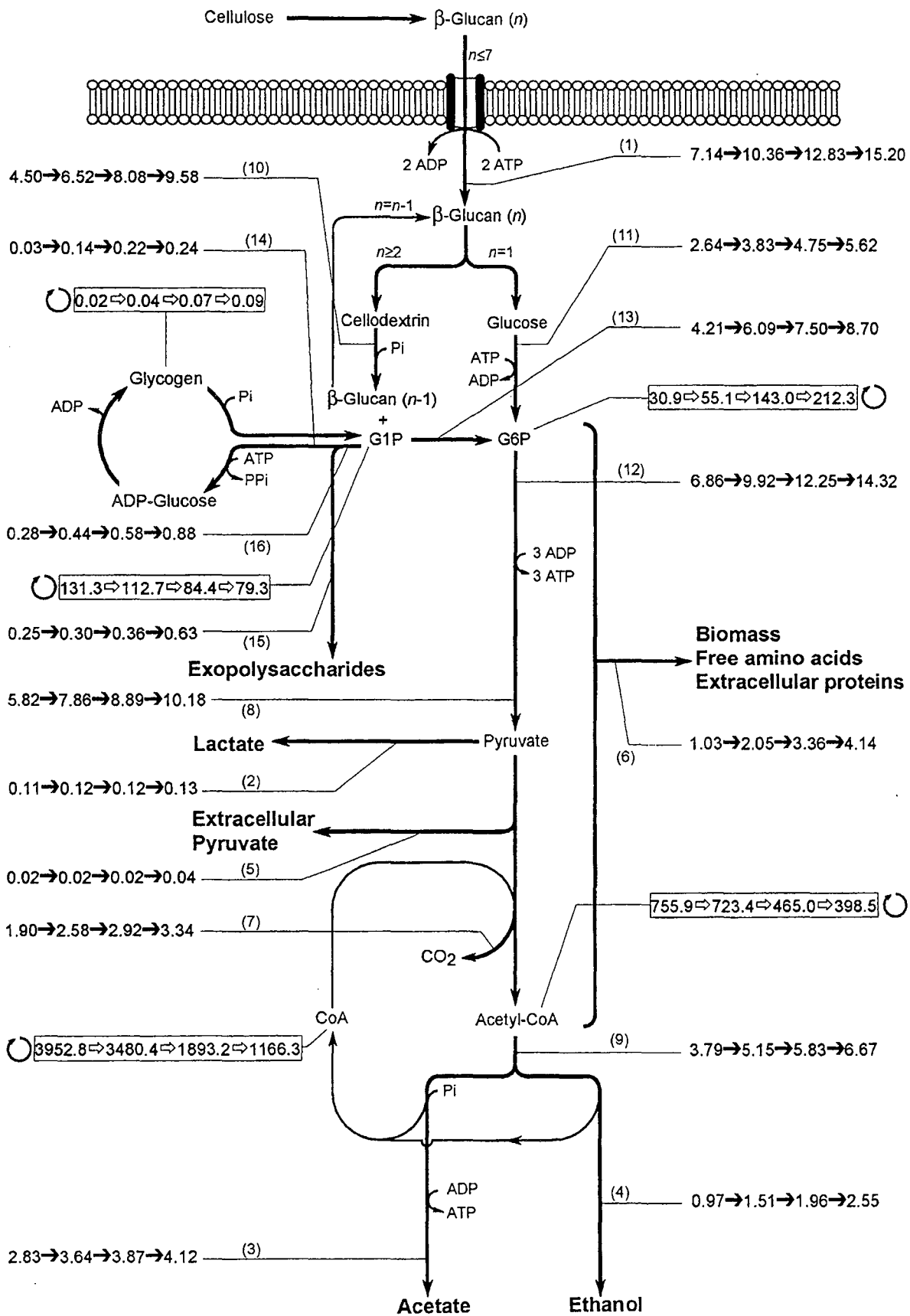


TABLE 7. Kinetic and growth parameters of various species of cellulolytic bacteria determined in continuous cultures^d

| Bacterial strain | Substrate | k (h ⁻¹) | m (mmol of hexose eq [g of cells] ⁻¹ h ⁻¹) | $Y_{X/S}^{\max}$ (g of cells [mol of hexose eq] ⁻¹) | Reference |
|--|--------------|------------------------|---|---|------------|
| <i>Clostridium cellulolyticum</i> ATCC 35319 | MN301 | 0.05 | 0.9 | 50.5 | This study |
| | Cellobiose | | 0.9 ^b | 36.2 ^b | 25 |
| <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 | Avicel | 0.17 ^b | ND | 24.3 ^b | 37 |
| <i>Fibrobacter succinogenes</i> S85 | Sigmacell 20 | 0.09 ^c | 0.3 ^{b,c} | 56.7 ^b | 73 |
| <i>Ruminococcus albus</i> 7 | Avicel | 0.05 | 0.6 ^b | 20.1 ^b | 47 |
| <i>R. flavefaciens</i> FD1 | Sigmacell 20 | 0.11 | 0.4 ^b | 38.9 ^b | 75 |

^a k is the rate constant of cellulose degradation; m is the growth maintenance coefficient; $Y_{X/S}^{\max}$ is the true growth yield. ND, not determined.

^b Calculated from previously reported data.

^c Average of previously reported data.

pling between catabolism and anabolism), where exopolysaccharides and glycogen could represent up to 16.0 and 21.4%, respectively, of the specific rate of carbon consumed and where cellotriose was detected extracellularly (22). Glycogen was synthesized even in carbon-limited conditions and was present at all dilution rates. Such observations parallel those for *Fibrobacter succinogenes*, for which futile cycling of glycogen was reported (18, 38). These results could suggest that glycogen biosynthesis in cellulolytic bacteria is involved in carbon flow regulation (7) rather than in prolonging cell viability by providing energy storage (54) as for sporogenesis (49). Such a cycle could also be considered an energy-wasting reaction, as suggested by use of the term "futile cycle" for glycogen metabolism in *Fibrobacter*; however, here cellulose-fed continuous cultures were energy-limited cultures which do not normally waste ATP (57).

The flow of carbon was facilitated by the increase of specific enzymatic activity as μ increased. The fact that metabolic fluxes were much less than the available enzyme activities (except for PGM as specified above) indicated that specific enzyme activities were limited by the supply of substrate. The decline of acetyl-CoA turnover was corroborated by the analysis of metabolic flux distribution; the percentage of the carbon flowing through PFO diminished as D increased and the flux was directed away from acetate production. The acetyl-CoA/CoA ratio decreased and paralleled the decline of the ratios H_2/CO_2 and $q_{NADH\ produced}/q_{NADH\ used}$. These results are in agreement with the model of Decker et al. (11, 66) for the regulation of NADH-fd reductase activities which, through the consumption of NADH, direct the fluxes of metabolites in the direction of acetate for ATP production. On cellulose, the cells manage to maintain an equilibrated electron balance through the hydrogenase NADH-fd reductase activities and the ethanol pathway as indicated by the O/R index (23, 24). The pyruvate and acetyl-CoA branch points were parts of an independent two-node metabolic network (60). From acetyl-CoA, the main end product formed was acetate, but partitioning of the flux was modified in favor of ethanol production as D increased. Pyruvate was catabolized mainly via PFO. Whatever the D , the extracellular pyruvate formation rate was low and was correlated with the low lactate production which, moreover, represented less and less of the $q_{pyruvate}$; the specific formation rates of both lactate and extracellular pyruvate represented a maximum of 1.8% of the original carbon uptake. Thus, whatever the D , there was no competition between PFO and LDH for the carbon flowing from glycolysis, contrary to what was ob-

served on soluble sugar (24, 25). On cellobiose, lactate and extracellular pyruvate levels rose with increasing specific rates of consumed hexose higher than 2.82 mmol (g of cells)⁻¹ h⁻¹ (24), while on cellulose q_{hexose} reached a maximum of 2.53 mmol (g of cells)⁻¹ h⁻¹.

The m_{ATP} obtained on cellulose, i.e., 2.9 mmol of ATP/g of cells/h, was very close to that obtained on cellobiose ($r^2 = 0.923$), i.e., 2.2 mmol of ATP/g of cells/h; as well, the true energetic yield on cellobiose was 28.4 g of biomass per mol of ATP, near the Y_{ATP}^{\max} of 30.3 g of biomass per mol of ATP obtained on cellulose (values for the cellobiose-limited chemostat calculation were taken from a previous report 24). As for the true growth yield, the $Y_{X/S}^{\max}$ determined on cellobiose was lower than that on cellulose (Table 7). From statistical analysis of the Pirt plots, following regression analysis and Student t test (9) of the data, the maximum true growth yields were significantly different. This indicated a benefit for cells when grown on cellulose since a higher biomass could be reached for the same hexose equivalent quantity consumed. Such a result is consistent with the mechanism of carbohydrate uptake described by Strobel et al. (62), which is an energy-efficient transport system of soluble cellodextrins released from cellulolysis.

This investigation has also allowed characterization of the cellulose degradation properties of *C. cellulolyticum* from the consistent data summarized in Table 7. Our data were compiled along with those of other chemostat cultures performed with cellulose as described in the current literature. *R. albus* and *C. cellulolyticum* appear to be the bacteria with the lowest first-order cellulose hydrolysis rate constant; it is 3.4 times lower than that of *C. thermocellum*, which is the highest one so far determined, 0.17 h⁻¹. Although a high cellulose degradation rate is often regarded as a general feature of thermophilic microorganisms relative to mesophilic species (37), such a difference in the rate constant of cellulose degradation could also result from the difference in cellulosic substrates used; in fact, the relative crystallinity index, porosity, allomorphs, capillary or gross surface area of the cellulose used could result in different kinetics of cellulose degradation (72, 73). Thus, the comparison of rate constant of cellulose digestion should not be overinterpreted, a caveat which points out the necessity of standardization of cellulose substrates used in such studies for further direct comparison. The true growth yield is among the highest reported, i.e., 50.5 g of cells/mol of hexose eq (Table 7). The growth maintenance coefficient reported in the literature could not be truly comparable since the rate of consumed hexose required for maintenance is related to the metabolic

pathway which allowed the ATP production (57, 61, 65). Since the catabolic networks vary among the reported bacterial species (Table 7), differences in m values could be attributed to ATP generating a more or less efficient pathway that thus requires more or less hexose equivalents but can generate the same quantity of ATP per gram of cells per hour. Thus, comparison of m_{ATP} between cellulolytic bacteria would be more informative for evaluating the energy maintenance requirement.

The first step in investigating *C. cellulolyticum* metabolism was the use of a chemostat technique which leads to the accumulation of NADH (48). The use of a mineral salt-based medium permitted the induction of different metabolic regulatory responses and better control of the carbon and electron flows (24). Such findings led to the hypothesis of growth adapted to nutrient-poor conditions (23). These studies, however, were performed with soluble sugars, which facilitated study of the bacterial metabolism of cellulolytic bacteria. The next step was therefore investigation of the physiology of this microorganism on an insoluble substrate, more closely related to the natural ecological niche. In the present work with cellulose-limited continuous culture, no accumulation of NADH was observed and pyruvate overflow as high as on cellobiose chemostats did not occur (24). The insolubility and resistance of the cellulose to enzymatic hydrolysis physically prevents pyruvate overflow since μ_{max} and carbon flow are inevitably lower than with a soluble substrate (24). Thus, on cellobiose-limited chemostats, some metabolic regulation such as the shift from acetate-ethanol fermentation to lactate-ethanol fermentation at high catabolic rates should be interpreted as a deregulation of the metabolism attributed to the growth of *C. cellulolyticum* on soluble sugars which represent conditions far from the physical nature of the cellulose. In cellulose continuous cultures, compared to cellobiose chemostats, a second regulation of the entering carbon was introduced by the depolymerization of the insoluble substrate into soluble sugars readily metabolized by bacteria for growth. This limitation led to a lower maximum specific growth rate reached on cellulose than on cellobiose; in turn, pyruvate leakage was limited. The observations with cellobiose chemostats should be interpreted as laboratory artifacts due to culture conditions far from those in which this bacterium has evolved in nature and emphasizes that the efficiency of catabolism is related to the degradative property of the bacterial cellulosome. In the course of evolution, the catabolic pathways are optimized as a function of the carbon flowing from cellulase activities and are not adapted to higher catabolic rates as in other clostridial bacteria (43). *C. cellulolyticum* appeared, therefore, well adapted and even restricted to a low carbon flow, which is characteristic of growth on its natural substrate, cellulose.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Commission of European Communities FAIR program (contract CT950191 [DG12SSMA]) and by the program Agrice (contract 9701041).

We thank J. Mejean for statistical analysis of the data, E. McRae for correcting the English and for critical reading of the manuscript, and G. Raval for technical assistance.

REFERENCES

1. Ahn, H. J., and L. R. Lynd. 1996. Cellulose degradation and ethanol production by thermophilic bacteria using mineral growth medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57-58:599-604.
2. Andersch, W., H. Bahl, and G. Gottschalk. 1983. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18:327-332.
3. Andersen, K. B., and K. von Meyenburg. 1977. Charges of nicotinamide adenine nucleotides and adenylate energy charge as regulatory parameters of the metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252:4151-4156.
4. Bayer, E. A., H. Chanzy, R. Lamed, and Y. Shoham. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:548-557.
5. Bayer, E. A., and R. Lamed. 1992. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation* 3:171-188.
6. Béguin, P., and M. Lemaire. 1996. The cellulosome: an exocellular, multi-protein complex specialized in cellulose degradation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 31:201-236.
7. Belanger, A. E., and G. F. Hatfull. 1999. Exponential-phase glycogen recycling is essential for growth of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 181:6670-6678.
8. Boisset, C., H. Chanzy, B. Henrissat, R. Lamed, Y. Shoham, and E. A. Bayer. 1999. Digestion of crystalline cellulose substrates by *Clostridium thermocellum* cellulosome: structural and morphological aspects. *Biochem. J.* 340:829-835.
9. Bouyer, J. 1996. Méthodes statistiques: médecine-biologie. ESTEM Éditions INSERM, Paris, France.
10. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
11. Decker, K., M. Rössle, and J. Kreusch. 1976. The role of nucleotides in the regulation of the energy metabolism of *Clostridium kluyveri*, p. 75-83. In H. G. Schlegel, G. Gottschalk, and N. Pfennig (ed.), *Microbial production and utilization of gases*, Akademie der Wissenschaften zu Göttingen, Göttingen, Germany.
12. Desvaux, M., E. Guedon, and H. Petitdemange. 2000. Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2461-2470.
13. Dubois, M., K. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168:167.
14. Dürre, P., A. Kuhn, M. Gottwald, and G. Gottschalk. 1987. Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:268-272.
15. Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70-77.
16. Ferdinand, W. 1964. The isolation and specific activity of rabbit muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochem. J.* 92:578-585.
17. Fersht, A. 1985. Enzyme structure and mechanism. W. H. Freeman and Co., New York, N.Y.
18. Gaudet, G., E. Forano, G. Dauphin, and A. M. Delort. 1992. Futile cycling of glycogen in *Fibrobacter succinogenes* as shown by in situ ¹H-NMR and ¹³C-NMR investigation. *Eur. J. Biochem.* 207:155-162.
19. Gelhaye, E., A. Gehin, and H. Petitdemange. 1993. Colonization of crystalline cellulose by *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3154-3156.
20. Gelhaye, E., H. Petitdemange, and R. Gay. 1993. Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose. *J. Bacteriol.* 175:3452-3458.
21. Giallo, J., C. Gaudin, and J. P. Belaich. 1985. Metabolism and solubilization of cellulose by *Clostridium cellulolyticum* H10. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1216-1221.
22. Guedon, E., M. Desvaux, and H. Petitdemange. 2000. Kinetic analysis of *Clostridium cellulolyticum* carbohydrate metabolism: importance of glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate branch points for distribution of carbon fluxes inside and outside cells as revealed by steady-state continuous culture. *J. Bacteriol.* 182:2010-2017.
23. Guedon, E., M. Desvaux, S. Payot, and H. Petitdemange. 1999. Growth inhibition of *Clostridium cellulolyticum* by an inefficiently regulated carbon flow. *Microbiology* 145:1831-1838.
24. Guedon, E., S. Payot, M. Desvaux, and H. Petitdemange. 1999. Carbon and electron flow in *Clostridium cellulolyticum* grown in chemostat culture on synthetic medium. *J. Bacteriol.* 181:3262-3269.
25. Guedon, E., S. Payot, M. Desvaux, and H. Petitdemange. 2000. Relationships between cellobiose catabolism, enzyme levels and metabolic intermediates in *Clostridium cellulolyticum* grown in a synthetic medium. *Biotechnol. Bioeng.* 67:327-335.
26. Gottschalk, G. 1985. Bacterial metabolism. Springer-Verlag, New York, N.Y.
27. Hazlewood, G. P., and H. J. Gilbert. 1993. Xylan and cellulose utilization by the clostridia, p. 311-341. In D. R. Woods (ed.), *The clostridia and biotech-*

- nology. Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
28. Holms, H. 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. 19:85-116.
 29. Huang, L., and C. W. Forsberg. 1990. Cellulose digestion and cellulase regulation and distribution in *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol. 56:1221-1228.
 30. Kistner, A., and J. H. Kornelius. 1990. A small-scale, three-vessel, continuous culture system for quantitative studies of plant fibre degradation by anaerobic bacteria. J. Microbiol. Methods 12:173-182.
 31. Kleijntjens, R. H., P. A. De Boks, and K. C. A. M. Luyben. 1986. A continuous thermophilic cellulose fermentation in an upflow reactor by a *Clostridium thermocellum* containing mixed culture. Biotechnol. Lett. 8:667-672.
 32. Lamed, R., and J. G. Zeikus. 1980. Ethanol production by thermophilic bacteria: relationship between fermentation product yields of and catabolic enzyme activities in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii*. J. Bacteriol. 144:569-578.
 33. Lee, S. F., C. W. Forsberg, and L. N. Gibbins. 1985. Xylanolytic activity of *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Environ. Microbiol. 50:1068-1076.
 34. Leschine, S. B. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. Annu. Rev. Microbiol. 49:399-426.
 35. Ljungdahl, L. G., and K. E. Eriksson. 1985. Ecology of microbial cellulose degradation. Adv. Microb. Ecol. 8:237-299.
 36. Lowry, O. H., and J. V. Passonneau. 1969. Phosphoglucomutase kinetics with the phosphates of fructose, glucose, mannose, ribose and galactose. J. Biol. Chem. 244:910-916.
 37. Lynd, L. R., H. E. Grethlein, and R. H. Wolkin. 1989. Fermentation of cellulosic substrates in batch and continuous culture of *Clostridium thermocellum*. Appl. Environ. Microbiol. 55:3131-3139.
 38. Matheron, C., A. M. Delort, G. Gaudet, E. Forano, and T. Liptaj. 1998. ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance study of glycogen futile cycling in strains of the genus *Fibrobacter*. Appl. Environ. Microbiol. 64:74-81.
 39. Meinecke, B., J. Bertram, and G. Gottschalk. 1989. Purification and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*. Arch. Microbiol. 152:244-250.
 40. Mitchell, W. J. 1998. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. Adv. Microbiol. Physiol. 39:31-130.
 41. Mokrasch, L. C. 1967. Use of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid for the coestimation of amines, amino acids, and proteins in mixtures. Anal. Biochem. 18:64-71.
 42. Monod, J. 1950. La technique de culture continue théorie et applications. Ann. Inst. Pasteur 79:390-410.
 43. Morrison, M., R. I. Mackie, and A. Kistner. 1990. 3-Phenylpropanoic acid improves the affinity of *Ruminococcus albus* for cellulose in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 56:3220-3222.
 44. Papoutsakis, E. T. 1984. Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. Biotechnol. Bioeng. 26:174-187.
 45. Papoutsakis, E. T., and C. I. Meyer. 1985. Equations and calculations of product yields and preferred pathways for butanediol and mixed-acid fermentations. Biotechnol. Bioeng. 27:50-66.
 46. Pavlostathis, S. G., T. L. Miller, and M. J. Wolin. 1988. Fermentation of insoluble cellulose by continuous cultures of *Ruminococcus albus*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2655-2659.
 47. Pavlostathis, S. G., T. L. Miller, and M. J. Wolin. 1988. Kinetics of insoluble cellulose fermentation by continuous cultures of *Ruminococcus albus*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2660-2663.
 48. Payot, S., E. Guedon, C. Cailliez, E. Gelhaye, and H. Petitdemange. 1998. Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth. Microbiology 144:375-384.
 49. Payot, S., E. Guedon, M. Desvaux, E. Gelhaye, and E. Petitdemange. 1999. Effect of dilution rate, cellobiose and ammonium availabilities on *Clostridium cellulolyticum* sporulation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52:670-674.
 50. Peck, H. D., and H. A. Gest. 1956. A new procedure for assay of bacterial hydrogenases. J. Bacteriol. 71:70-80.
 51. Pereira, A. N., M. Mobeidhashi, and M. R. Ladish. 1988. Preparation of celldextrins. Methods Enzymol. 160:26-45.
 52. Petitdemange, E., F. Caillet, J. Giallo, and C. Gaudin. 1984. *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic mesophilic species from decayed grass. Int. J. Syst. Bacteriol. 34:155-159.
 53. Pirt, S. J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, United Kingdom.
 54. Preiss, J. 1996. Regulation of glycogen synthesis, p. 1015-1024. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, Jr., B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed., vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 55. Raftar, G. W., and S. P. Colowick. 1957. Enzymatic preparation of DPNH and TPNH. Methods Enzymol. 3:887-899.
 56. Russell, J. B. 1985. Fermentation of celldextrins by cellulolytic and non-cellulolytic rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 49:572-576.
 57. Russell, J. B., and G. M. Cook. 1995. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. Microbiol. Rev. 59:48-62.
 58. Shi, Y., C. L. Odt, and P. J. Weimer. 1997. Competition for cellulose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. Appl. Environ. Microbiol. 58:2583-2591.
 59. Shi, Y., and P. J. Weimer. 1992. Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 58:2583-2591.
 60. Stephanopoulos, G., and J. J. Vallino. 1991. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. Science 252:1675-1681.
 61. Stouthamer, A. H. 1969. Determination and significance of molar growth yields. Methods Microbiol. 1:629-663.
 62. Strobel, H. J., F. C. Caldwell, and K. A. Dawson. 1995. Carbohydrate transport by the anaerobic thermophile *Clostridium thermocellum* LQRI. Appl. Environ. Microbiol. 61:4012-4015.
 63. Taguchi, F., K. Yamada, K. Hasegawa, T. Taki-Saito, and K. Hara. 1996. Continuous hydrogen production by *Clostridium* sp. strain no. 2 from cellulose hydrolysate in an aqueous two-phase system. J. Ferment. Bioeng. 82: 80-83.
 64. Tempest, D. W. 1970. The continuous cultivation of microorganisms. I. Theory of the chemostat. Methods Microbiol. 2:259-276.
 65. Tempest, D. W., and O. M. Neijssel. 1984. The status of Y_{ATP} and maintenance energy as biologically interpretable phenomena. Annu. Rev. Microbiol. 38:459-486.
 66. Thauer, R., C. Jungermann, and K. Decker. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev. 41:100-180.
 67. Tomme, P., R. A. J. Warren, and N. R. Gilkes. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. Adv. Microb. Physiol. 37:1-81.
 68. Tubbs, P. K., and P. B. Garland. 1969. Assay of coenzyme A and some acyl derivatives. Methods Enzymol. 13:535-551.
 69. Updegraff, D. M. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. Anal. Biochem. 32:420-424.
 70. Walsum, G. P., and L. R. Lynd. 1998. Allocation of ATP synthesis of cells and hydrolytic enzymes in cellulolytic fermentative microorganisms: bioenergetics, kinetics, and bioprocessing. Biotechnol. Bioeng. 58:316-320.
 71. Weimer, P. J. 1993. Effects of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose-fed continuous culture. Arch. Microbiol. 160:288-294.
 72. Weimer, P. J., J. M. Lopez-Guisa, and A. D. French. 1990. Effect of cellulose fine structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microorganisms in vitro. Appl. Environ. Microbiol. 56:2421-2429.
 73. Weimer, P. J., A. D. French, and T. A. Calamari. 1991. Differential fermentation of cellulose allomorphs by ruminal cellulolytic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57:3101-3106.
 74. Weimer, P. J., Y. Shi, and C. L. Odt. 1991. A segmented gas/liquid delivery system for continuous culture of microorganisms on insoluble substrates and its use for growth of *Ruminococcus flavefaciens* on cellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:178-183.
 75. 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.
 76. Wolin, M. J., and T. L. Miller. 1987. Bioconversion of organic carbon to CH₄ and CO₂. Geomicrobiol. J. 5:239-259.

III. Discussion

Les cultures continues sur cellulose et sur cellobiose en conditions de carbone limitant présentent les caractéristiques suivantes (Guedon *et al.*, 1999b) :

- des rapports ATP/ADP inférieurs à 1,
- une production de lactate réduite aux faibles vitesses spécifiques de croissance,
- des rapports NADH/NAD^+ et $q_{\text{NADH produit}}/q_{\text{NADH utilisé}}$ qui diminuent lorsque le taux de dilution augmente,

Sur cellulose l'embranchement entre le G1P et le G6P prend toute son importance puisque plus la cellodextrine soluble incorporée est longue, plus il y a de G1P généré. Le G1P se répartit entre les voies de formation du glycogène, des exopolysaccharides ou encore vers la glycolyse *via* la phosphoglucomutase (PGM). Au point de branchement du G1P-G6P, la PGM stabilise la proportion du flux carboné dirigée vers les biosynthèses et la formation des catabolites. Le surplus de carbone est quant à lui dissipé vers la formation d'exopolysaccharides ou stocké de façon transitoire sous forme de glycogène. La biosynthèse du glycogène est ajustée en fonction des besoins cellulaires et la PGM contrôle la partition du flux carboné vers la glycolyse. La proportion de carbone traversant la phosphoglucomutase reste d'environ 59% quel que soit le taux de dilution.

L'analyse du flux métabolique a montré que la proportion de carbone dirigé vers le G6P reste relativement constante quelle que soit la vitesse spécifique de croissance. Par contre une réorientation du flux carboné entre le $q_{\text{biosynthèse}}$ et le q_{pyruvate} s'opère. Le flux est majoritairement dirigé vers la formation de l'acétate au faible μ mais il se réoriente vers la production d'éthanol lorsque le μ augmente. Dans toutes les conditions de croissance, l'acétate et l'éthanol étaient les produits primaires majeurs du catabolisme. Contrairement à ce qui se passe dans une culture sur cellobiose (Guedon *et al.*, 1999b), la PFO et la LDH n'entrent pas en compétition pour le flux carboné issu de la glycolyse et aucun basculement métabolique d'une fermentation acétate-éthanol à une fermentation lactate-éthanol n'a été observé. Les $Y_{\text{ATP}}^{\text{max}}$ et m_{ATP} sont très semblables à ceux obtenus précédemment sur cellobiose ce qui indique que les besoins énergétiques pour les cellules sont équivalents pour ces deux substrats. Par contre le $Y_{\text{X/S}}^{\text{max}}$ déterminé sur cellobiose est plus faible que celui obtenu sur cellulose ; ceci indique qu'une croissance sur cellulose permet d'atteindre une biomasse plus importante pour la même quantité d'hexoses équivalents consommés. Ce résultat s'expliquerait par le mécanisme de transport et d'assimilation des glucides solubles issus de la cellulose proposés par Strobel *et al.* (1995).

Les résultats de l'étude du métabolisme de la cellulose obtenus chez *Clostridium cellulolyticum* sont difficilement comparables à ceux des autres bactéries cellulolytiques jusqu'ici cultivées en culture continue sur cellulose puisque :

- les rendements énergétiques (Y_{ATP}) et les maintenances énergétiques (m_{ATP}) n'ont jamais été déterminées. Les rendements de croissance ($Y_{X/S}$) et les maintenances (m) exprimées en mmol d'hexoses équivalents par gramme de biomasse et par heure sont quant à eux peu informatifs lorsqu'ils sont comparés entre différents micro-organismes puisqu'ils sont directement reliés aux voies métaboliques impliquées dans la production d'ATP, la consommation en substrat ne reflétant donc pas réellement les besoins énergétiques cellulaires.
- les taux de dégradation de la cellulose ayant été déterminés sur diverses celluloses commerciales ; les différences observées peuvent donc être dues à des différences de pourcentage de cristallinité, de type de réseau cristallin, de porosité ou encore de surface accessible des fibres de cellulose (Fields *et al.*, 2000 ; Weimer *et al.*, 1990, 1991a).

L'absence d'excrétion importante de pyruvate et de lactate indique que le flux carboné est mieux contrôlé sur cellulose que sur cellobiose et serait attribuée à la limitation du flux carboné entrant. En effet, une régulation supplémentaire du flux carboné est introduite sur cellulose par la nécessité d'hydrolyse du substrat insoluble en glucides solubles incorporables par la cellule.

E. Etude du catabolisme de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum* en culture continue : influence de la saturation en substrats sur la distribution des flux

I. Introduction

Les résultats obtenus au cours de cultures continues de *Clostridium cellulolyticum* dans des conditions de saturation de cellobiose sont différents de ceux obtenus en limitation de carbone (Guedon *et al.*, 1999b, 2000b). Alors que le flux électronique était orienté vers l'alcool déshydrogénase aux taux de dilution élevés en cellobiose limitant, celui-ci alimentait principalement la voie NADH-Fd oxydoréductase et de l'hydrogénase en saturation de substrats. Le rapport H_2/CO_2 augmentait tandis que la vitesse spécifique de formation de l'éthanol était stabilisée. Le flux carboné était donc essentiellement orienté vers l'acétate et peu de lactate était formé. Cette diminution de la production de lactate aux taux de dilution élevés s'accompagnait d'une excrétion de pyruvate limitée dans le surnageant de culture. La très faible production de lactate par *Clostridium cellulolyticum* serait le résultat d'un détournement du flux carboné entrant vers les exopolysaccharides. Cette étude montrait que cette bactérie était capable de contrôler les flux de carbone et d'électrons dans un milieu synthétique aussi bien lorsque le cellobiose est disponible en quantité limitante qu'en quantité saturante ; ceci confère à cette bactérie une certaine flexibilité métabolique compatible avec le modèle précédemment établi de croissance sur cellulose (Gehin *et al.*, 1996a ; Gelhaye *et al.*, 1993b, 1993c), où l'adhésion et la colonisation correspondent à un excès de carbone suivi du relargage des cellules qui correspond à une situation de limitation en substrat carboné (Guedon *et al.*, 1999b, 2000b).

Contrairement à ce qui avait été longtemps accepté, l'étude précédente a montré que l'utilisation d'un glucide soluble issu de la cellulolyse, tel que le cellobiose, ne mime pas réellement le métabolisme d'une bactérie cellulolytique sur cellulose (Desvaux *et al.*, 2001b). Chez *Clostridium cellulolyticum*, le flux carboné entrant est contrôlé par l'activité des cellulases du cellulosome ce qui permet à la cellule de mieux réguler son métabolisme sur cellulose comme l'indique l'absence de basculement métabolique, d'une fermentation acétate-éthanol à une fermentation éthanol-lactate, associé à une excrétion de pyruvate comme cela était observé sur cellobiose en conditions de carbone limitant (Desvaux *et al.*, 2001b ; Guedon *et al.*, 1999b). Le cellobiose étant une cellodextrine soluble, son utilisation comme seule et unique source de carbone et d'énergie shunte complètement le cellulosome. Ainsi, certaines régulations observées sur ce substrat soluble devraient plutôt être interprétées comme des dérégulations du métabolisme. Au cours de l'évolution, les voies cataboliques de *Clostridium cellulolyticum* ont vraisemblablement été optimisées en fonction du flux carboné issu des activités cellulasiques et ne sont donc pas adaptées à des flux cataboliques plus élevés comme

chez les autres clostridia saccharolytiques tels que *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum* ou encore *Clostridium pasteurianum* (Desvaux *et al.*, 2001b ; Mitchell, 1998).

Afin de vérifier dans quelle mesure les résultats obtenus précédemment sur cellobiose sont transposables sur cellulose, des cultures continues en conditions de saturation de cellulose ont été effectuées.

II. Résultats

Les résultats de cette étude ont conduit à la publication d'un article dans la revue *Applied and Environmental Microbiology* : "Kinetics and metabolism of cellulose degradation at high substrate concentrations in steady-state continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a chemically defined medium." 2001, 67 : 3837-3845.

Kinetics and Metabolism of Cellulose Degradation at High Substrate Concentrations in Steady-State Continuous Cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a Chemically Defined Medium

MICKAËL DESVAUX, EMMANUEL GUEDON, AND HENRI PETITDEMANGE*

Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +, Domaine Scientifique Victor Grignard, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex, France

Received 2 March 2001/Accepted 31 May 2001

The hydrolysis and fermentation of insoluble cellulose were investigated using continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* with increasing amounts of carbon substrate. At a dilution rate (D) of 0.048 h^{-1} , biomass formation increased proportionately to the cellulose concentration provided by the feed reservoir, but at and above 7.6 g of cellulose liter^{-1} the cell density at steady state leveled off. The percentage of cellulose degradation declined from 32.3 to 8.3 with 1.9 and 27.0 g of cellulose liter^{-1} , respectively, while cellobioside accumulation rose and represented up to 4.0% of the original carbon consumed. The shift from cellulose-limited to cellulose-sufficient conditions was accompanied by an increase of both the acetate/ethanol ratio and lactate biosynthesis. A kinetics study of *C. cellulolyticum* metabolism in cellulose saturation was performed by varying D with 18.1 g of cellulose liter^{-1} . Compared to cellulose limitation (M. Desvaux, E. Guedon, and H. Petitdemange, J. Bacteriol. 183:119–130, 2001), in cellulose-sufficient continuous culture (i) the ATP/ADP, NADH/NAD⁺, and $q_{\text{NADH produced}}/q_{\text{NADH used}}$ ratios were higher and were related to a more active catabolism, (ii) the acetate/ethanol ratio increased while the lactate production decreased as D rose, and (iii) the maximum growth yield ($Y_{X/S}^{\text{max}}$) (40.6 g of biomass per mol of hexose equivalent) and the maximum energetic yield ($Y_{\text{ATP}}^{\text{max}}$) (19.4 g of biomass per mol of ATP) were lowered. *C. cellulolyticum* was then able to regulate and optimize carbon metabolism under cellulose-saturated conditions. However, the facts that some catabolized hexose and hence ATP were no longer associated with biomass production with a cellulose excess and that concomitantly lactate production and pyruvate leakage rose suggest the accumulation of an intracellular inhibitory compound(s), which could further explain the establishment of steady-state continuous cultures under conditions of excesses of all nutrients. The following differences were found between growth on cellulose in this study and growth under cellobiose-sufficient conditions (E. Guedon, S. Payot, M. Desvaux, and H. Petitdemange, Biotechnol. Bioeng. 67:327–335, 2000): (i) while with cellobiose, a carbon flow into the cell of as high as 5.14 mmol of hexose equivalent g of cells⁻¹ h^{-1} could be reached, the maximum entering carbon flow obtained here on cellulose was 2.91 mmol of hexose equivalent g of cells⁻¹ h^{-1} ; (ii) while the NADH/NAD⁺ ratio could reach 1.51 on cellobiose, it was always lower than 1 on cellulose; and (iii) while a high proportion of cellobiose was directed towards exopolysaccharide, extracellular protein, and free amino acid excretions, these overflows were more limited under cellulose-excess conditions. Such differences were related to the carbon consumption rate, which was higher on cellobiose than on cellulose.

Cellulose is the most abundantly produced biopolymer on earth (5, 28). Due to its recalcitrant, durable nature, cellulose accumulates in terrestrial environments, where a variety of cellulolytic microorganism, existing in virtually every niche and climate, decompose it (4, 28, 29). Around 5 to 10% of cellulosic materials are degraded anaerobically, and the final products released during fermentation are methane and carbon dioxide (28, 51); among cellulolytic bacteria, clostridia play an important role in such processes (28).

Clostridium cellulolyticum, a nonruminant, strictly anaerobic, cellulolytic bacterium (45), digests cellulose through the cellulosome (43). This extracellular multienzymatic complex is composed of a variety of cellulases organized around a scaffolding protein called CipC (6, 41, 42). The cellulosomes are found at

the surface of the cells and allow both adhesion and efficient degradative activity against the cellulose fibers (3, 8).

Using cellobiose, which is one of the soluble cellooligosaccharides released during cellulolysis, major differences in the regulation of the carbon flow between carbon-limited and carbon-sufficient continuous cultures have been reported (19, 20). As the dilution rate increases, in cellobiose-limited chemostats the metabolic pathways towards ethanol and lactate contribute to balance the reducing equivalents supplied by acetate formation (19), while under cellobiose-saturated conditions (20) the redox balance is essentially maintained by NADH-ferredoxin (NADH-Fd) reductase-hydrogenase and ethanol dehydrogenase activities and the carbon flow is equilibrated by three overflows, i.e., exopolysaccharide, extracellular protein, and amino acid excretions.

Using a substrate more closely related to the natural ecosystem of the bacterium, recent investigations with cellulose-limited chemostats (11) have indicated that there is neither a shift from an acetate-ethanol fermentation to a lactate-ethanol fermentation nor pyruvate overflow at high catabolic rates as

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +, Domaine Scientifique Victor Grignard, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex, France. Phone: 33 3 83 91 20 53. Fax: 33 3 83 91 25 50. E-mail: hpetitde@lcb.uhp-nancy.fr.

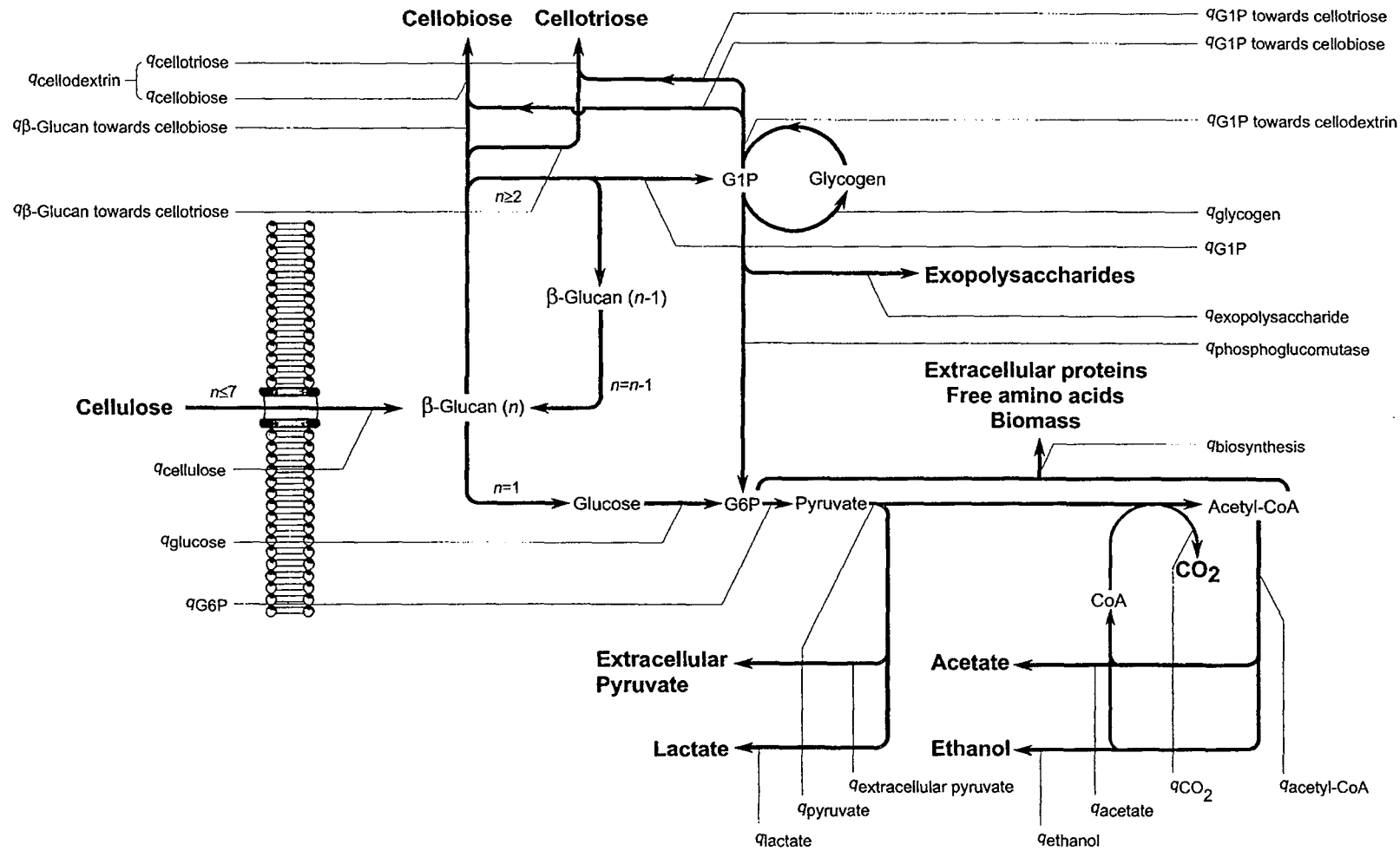


FIG. 1. Carbon flow within the central metabolic pathways of *C. cellulolyticum* grown in cellulose excess. n , number of hexose residues inside the biopolymer. The specific consumption and production rates (q) correspond to the equations given in Table 1.

TABLE 1. Calculations for flux analysis during cellulose-excess fermentation by *C. cellulolyticum* in chemostat culture

| Carbon flow ^a | Equation ^b |
|---|--|
| $q_{\text{cellulose}}$ | $(C_{\text{cellulose}}/X) \times D$ |
| $q_{\text{cellobiose}}$ | $(C_{\text{cellobiose}}/X) \times D$ |
| $q_{\text{cellotriose}}$ | $(C_{\text{cellotriose}}/X) \times D$ |
| q_{lactate} | $(C_{\text{lactate}}/X) \times D$ |
| q_{acetate} | $(C_{\text{acetate}}/X) \times D$ |
| q_{ethanol} | $(C_{\text{ethanol}}/X) \times D$ |
| $q_{\text{extracellular pyruvate}}$ | $(C_{\text{extracellular pyruvate}}/X) \times D$ |
| $q_{\text{biosynthesis}}$ | $[(C_{\text{biomass}} - C_{\text{glycogen}} + C_{\text{amino acid}} + C_{\text{protein}})/X] \times D$ |
| $q_{\text{carbon dioxide}}$ | $1/2 \times (q_{\text{acetate}} + q_{\text{ethanol}})$ |
| q_{pyruvate} | $q_{\text{acetate}} + q_{\text{ethanol}} + q_{\text{lactate}} + q_{\text{extracellular pyruvate}} + q_{\text{carbon dioxide}}$ |
| $q_{\text{acetyl-CoA}}$ | $q_{\text{acetate}} + q_{\text{ethanol}}$ |
| q_{G1P} | $0.63 \times q_{\text{cellulose}}$ |
| $q_{\text{G1P towards cellobiose}}$ | $1/2 \times q_{\text{cellobiose}}$ |
| $q_{\text{G1P towards cellotriose}}$ | $2/3 \times q_{\text{cellotriose}}$ |
| $q_{\text{G1P towards celloedextrin}}$ | $q_{\text{G1P towards cellobiose}} + q_{\text{G1P towards cellotriose}}$ |
| q_{glucose} | $0.37 \times q_{\text{cellulose}}$ |
| $q_{\text{celloedextrin}}$ | $q_{\text{cellobiose}} + q_{\text{cellotriose}}$ |
| $q_{\beta\text{-glucan towards cellobiose}}$ | $1/2 \times q_{\text{cellobiose}}$ |
| $q_{\beta\text{-glucan towards cellotriose}}$ | $1/3 \times q_{\text{cellotriose}}$ |
| $q_{\beta\text{-glucan towards celloedextrin}}$ | $q_{\beta\text{-glucan towards cellobiose}} + q_{\beta\text{-glucan towards cellotriose}}$ |
| q_{G6P} | $q_{\text{biosynthesis}} + q_{\text{pyruvate}}$ |
| $q_{\text{phosphoglucomutase}}$ | $q_{\text{G6P}} - q_{\text{glucose}}$ |
| q_{glycogen} | $(C_{\text{glycogen}}/X) \times D$ |
| $q_{\text{exopolysaccharide}}$ | $q_{\text{G1P}} - q_{\text{phosphoglucomutase}} - q_{\text{glycogen}} - q_{\text{celloedextrin}}$ |

^a Carbon flows are diagrammed in Fig. 1.

^b C is the concentration in meqC liter⁻¹ of compound produced or consumed; X is the biomass concentration expressed as grams liter⁻¹; D is the dilution rate in hour⁻¹; and q is the specific metabolic rate in meqC gram of cells⁻¹ hour⁻¹.

previously observed on cellobiose (18, 19). Thus, with this culture condition, *C. cellulolyticum* appeared well adapted and even restricted to a cellulolytic lifestyle (11, 12). In its natural biota, however, growth under carbon-sufficient conditions is undoubtedly experienced by bacteria and probably more frequently than carbon limitation, since cellulose accumulates in environments (4, 5).

The aim of the present study, then, was to investigate kinetically the *C. cellulolyticum* fermentation under carbon-saturated conditions by using continuous culture analysis with cel-

lulose and a mineral salt-based medium, which are more closely related to the natural ecosystem of the bacterium (11, 19).

MATERIALS AND METHODS

Organism and growth conditions. *C. cellulolyticum* ATCC 35319 (45) was cultured as previously reported (10) on a defined medium (19) containing cellulose MN301 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) at various concentrations as specified in Results. All experiments in segmented gas-liquid continuous culture (49) were performed in a 1.5-liter-working-volume fermentor (LSL Biolafitte, St.

TABLE 2. Fermentation parameters from continuous culture of *C. cellulolyticum* with increasing concentrations of cellulose at a D value of 0.048 h⁻¹

| Parameter (unit) | Results ^a obtained with a cellulose concn (g liter ⁻¹) of: | | | | |
|---|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 1.9 | 3.8 | 7.6 | 14.4 | 27.0 |
| Biomass (g liter ⁻¹) | 0.095 ± 0.008 | 0.195 ± 0.017 | 0.212 ± 0.023 | 0.297 ± 0.031 | 0.294 ± 0.033 |
| Consumed cellulose (mM hexose eq) | 3.7 ± 0.2 | 7.7 ± 0.3 | 9.7 ± 0.5 | 14.3 ± 0.8 | 13.9 ± 0.7 |
| $q_{\text{cellulose}}$ (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 1.87 | 1.89 | 2.21 | 2.31 | 2.26 |
| Acetate (mM) | 3.50 ± 0.13 | 7.59 ± 0.21 | 10.59 ± 0.37 | 17.03 ± 0.55 | 16.04 ± 0.57 |
| Ethanol (mM) | 1.73 ± 0.07 | 3.34 ± 0.11 | 3.64 ± 0.14 | 4.29 ± 0.17 | 4.15 ± 0.13 |
| Lactate (mM) | 0.05 ± 0.01 | 0.13 ± 0.01 | 0.62 ± 0.03 | 0.56 ± 0.02 | 0.75 ± 0.03 |
| Extracellular pyruvate (μM) | 11.4 ± 0.7 | 33.3 ± 1.8 | 161.6 ± 9.1 | 179.2 ± 8.5 | 194.6 ± 10.2 |
| Glycogen (mg g of cells ⁻¹) | 99.1 ± 3.7 | 102.3 ± 3.1 | 55.6 ± 1.9 | 61.4 ± 2.5 | 62.7 ± 2.2 |
| Cellobiose (mM) | ND ^b | ND | 0.08 ± 0.02 | 0.15 ± 0.02 | 0.17 ± 0.05 |
| Cellotriose (mM) | ND | ND | 0.04 ± 0.01 | 0.06 ± 0.02 | 0.07 ± 0.01 |
| Extracellular proteins (mg liter ⁻¹) | 8.4 ± 0.5 | 14.1 ± 0.7 | 9.9 ± 0.4 | 6.1 ± 0.3 | 7.6 ± 0.3 |
| Free amino acids (mg liter ⁻¹) | 33.0 ± 1.7 | 62.4 ± 3.9 | 77.7 ± 4.2 | 118.1 ± 5.7 | 112.4 ± 6.1 |
| $Y_{X/S}$ (g of cells mol of hexose eq ⁻¹) | 25.6 | 25.4 | 21.8 | 20.8 | 21.2 |
| Y_{ATP} (g of cells mol of ATP eq ⁻¹) | 11.2 | 10.8 | 8.6 | 7.9 | 8.2 |
| q_{ATP} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 4.27 | 4.43 | 5.56 | 6.08 | 5.84 |
| Carbon recovery (%) | 95.3 | 95.5 | 97.4 | 96.8 | 96.1 |

^a Values are the averages for samples at steady state ± standard deviations. Values without standard deviations were determined with an average accuracy of ±10%.

^b ND, not detectable.

TABLE 3. Fermentation parameters from continuous steady-state cultures^a of *C. cellulolyticum* under cellulose-sufficient conditions

| Parameter (unit) | Results ^b obtained at a <i>D</i> value (h ⁻¹) of: | | | |
|--|--|---------------|---------------|-----------------|
| | 0.026 | 0.051 | 0.061 | 0.080 |
| Biomass (g liter ⁻¹) | 0.367 ± 0.034 | 0.266 ± 0.023 | 0.205 ± 0.019 | 0.161 ± 0.012 |
| Consumed cellulose (mM hexose eq) | 23.3 ± 1.1 | 12.2 ± 0.6 | 8.5 ± 0.4 | 5.95 ± 0.3 |
| <i>q</i> _{cellulose} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 1.65 | 2.33 | 2.53 | 2.91 |
| Product yield (%) of <i>q</i> _{pyruvate} | | | | |
| Acetate | 70.8 | 75.5 | 76.6 | 78.0 |
| Ethanol | 24.1 | 21.2 | 20.8 | 20.5 |
| Lactate | 5.2 | 3.3 | 2.6 | 1.5 |
| Extracellular pyruvate | 0.8 | 0.5 | 0.4 | 0.3 |
| <i>q</i> _{pyruvate} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 2.68 | 3.55 | 3.67 | 4.02 |
| Glycogen (mg g of cells ⁻¹) | 52.3 ± 1.7 | 63.6 ± 2.3 | 95.4 ± 3.5 | 81.2 ± 2.8 |
| Cellobiose (mM) | 0.24 ± 0.09 | 0.10 ± 0.04 | 0.07 ± 0.02 | ND ^c |
| Celotriose (mM) | 0.11 ± 0.05 | 0.05 ± 0.02 | 0.03 ± 0.01 | ND |
| Extracellular proteins (mg liter ⁻¹) | 13.9 ± 0.7 | 6.2 ± 0.4 | 4.4 ± 0.3 | 2.2 ± 0.1 |
| Free amino acids (mg liter ⁻¹) | 190.6 ± 8.5 | 104.9 ± 5.9 | 62.9 ± 3.7 | 47.1 ± 2.1 |
| <i>Y</i> _{X/S} (g of cells mol of hexose eq ⁻¹) | 15.8 | 21.9 | 24.1 | 27.5 |
| Carbon recovery (%) | 97.4 | 96.7 | 93.5 | 92.9 |

^a The cellulose input was 1.81% (wt/vol), and ammonium was at 15.13 mM.

^b Values are the averages for samples at steady state ± standard deviations. Values without standard deviations were determined with an average accuracy of ±10%.

^c ND, not detectable.

Germain en Laye, France) at 34°C and pH 7.2 and monitored as previously indicated (11).

Analytical procedures. Biomass, cellulose concentration, gas analysis, extracellular protein, amino acid, glucose, soluble cellobioses, glycogen, acetate, ethanol, lactate, and extracellular pyruvate were determined as described previously (10, 11, 17).

The percentage of cells that were nonadherent to cellulose fibers was determined by vacuum filtration through 3-µm-pore-size polycarbonate membrane (Millipore, Molsheim, France) as described by Wells et al. (50).

The intracellular compounds NAD⁺, NADH, ATP, ADP, AMP, glucose-1-phosphate (G1P), and glucose-6-phosphate (G6P) and the enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12), pyruvate-Fd oxidoreductase (PFO) (EC 1.2.7.1), lactate dehydrogenase (LDH) (EC 1.1.1.27), acetate kinase (AK) (EC 2.7.2.1), and alcohol dehydrogenase (ADH) (EC 1.1.1.1) were extracted and assayed as reported previously (11, 17).

Calculations. The metabolic pathways and equations for cellulose fermentation by *C. cellulolyticum* (expressed as *n* hexose equivalents [hexose eq], corresponding to *n* glucose residues of the cellulose chain) were reported previously (10, 11).

The specific rate of hexose residue fermentation (*q*_{cellulose}) and the specific rates of product formation (*q*_{acetate}, *q*_{ethanol}, *q*_{extracellular pyruvate}, *q*_{lactate}, and *q*_{pyruvate}) are expressed in millimoles per gram of cells per hour and were calculated as indicated previously (11). *q*_{NADH produced} and *q*_{NADH used} are the specific rates of NADH production and NADH consumption, respectively, in millimoles per gram of cells per hour and were calculated as follows: *q*_{NADH produced} = *q*_{pyruvate}, and *q*_{NADH used} = 2 *q*_{ethanol} + *q*_{lactate}. *q*_{NADH-Fd} was the specific rate of H₂ production via the NADH-Fd-H₂ path and corresponded to *q*_{NADH produced} - *q*_{NADH used}.

The molar growth yield (*Y*_{X/S}) was expressed in grams of cells per mole of hexose eq fermented. The energetic yield of biomass (*Y*_{ATP}) was expressed in grams of cells per mole of ATP produced and calculated as described previously (11): *Y*_{ATP} = concentration_{biomass} / (1.94 concentration_{acetate} + 0.94 concentration_{ethanol} + 0.94 concentration_{lactate} + 0.94 concentration_{extracellular pyruvate}). The specific rate of ATP generation (*q*_{ATP}) was expressed in millimoles per gram of cells per hour and calculated by the following equation (11): *q*_{ATP} = 1.94 *q*_{acetate} + 0.94 *q*_{ethanol} + 0.94 *q*_{lactate} + 0.94 *q*_{extracellular pyruvate}. The energetic efficiency (ATP-Eff) corresponding to the ATP generation in cellulose catabolism is given by the ratio of *q*_{ATP} to *q*_{cellulose} (11).

A Pirt plot was used for the determination of the maximum yield (*Y*^{max}) and the maintenance coefficient (*m*) (46). The energetic charge and oxidation/reduction index (O/R) were calculated as described by Gottschalk (22). The first-order rate constant of cellulose removal was determined with the equation established by Pavlostathis et al. (44) as described previously (11).

Determination of the distribution of the carbon flow by stoichiometric flux analysis (9) was done by adapting the model developed by Holms (26) to *C. cellulolyticum* metabolism as depicted in Fig. 1. For further direct calculation of

the carbon flow at steady state through each enzyme of the known metabolic pathways, the fluxes were expressed in milliequivalents of carbon (meqC) per gram of cells per hour and calculated as indicated in Table 1.

The turnover of a pool (hours⁻¹) corresponded to the rate of input or output divided by the pool size, which is then the number of times that the pool turns over every hour (27). *R* is the ratio of the specific enzyme activity to metabolic flux (11, 27).

RESULTS

***C. cellulolyticum* continuous culture with increasing concentrations of cellulose.** *C. cellulolyticum* was grown on cellulose in independent runs using a segmented gas-liquid continuous culture device at a dilution rate of 0.048 h⁻¹ with substrate concentrations ranging from 1.9 to 27.0 g liter⁻¹ (Table 2). With increasing amounts of substrate, the concentration of consumed cellulose rose, but at above 7.6 g liter⁻¹ (i.e., 47.0 mM hexose eq) the concentration of consumed cellulose stagnated at 13.9 to 14.3 mM hexose eq (Table 2). The biomass concentration at each steady state increased with the cellulose concentration in the feed medium reservoir, but at above 7.6 g liter⁻¹ it remained quite constant at around 0.296 g liter⁻¹ (Table 2), and thus the production of biomass paralleled the amount of digested cellulose. Microscopic examination indicated that at low cellulose concentrations unattached cells were observable and that almost all of the cellulose fibers were colonized by bacteria. All of these results indicated that at above 7.6 g of cellulose liter⁻¹, continuous cultures were carried out under cellulose-sufficient conditions.

Shifting from cellulose-limited to cellulose-excess conditions was accompanied by a drop of both *Y*_{X/S} and *Y*_{ATP}, whereas *q*_{ATP} increased (Table 2), showing that an uncoupling growth phenomenon occurred. The shift from cellulose limitation to cellulose saturation was accompanied by an increase of lactate biosynthesis (Table 2) as well as the acetate/ethanol ratio, which increased from 2.02 to 3.86 with 1.9 and 27.0 g of cellulose liter⁻¹, respectively. As lactate production rose, extracellular pyruvate production increased as well (Table 2). The decrease in ethanol production in favor of acetate production

was associated with additional ATP, explaining the fact that the q_{ATP} increased during the shift to cellulose saturation (Table 2).

On a synthetic medium, cellulose was converted into cell mass, fermentative catabolites, extracellular amino acids, and proteins (Table 2). Exopolysaccharides were observable by microscopic examination but could not be measured due to significant interference, as already explained (11). While cello-dextrins were not present in cellulose limitation, cellobiose and cellotriose were detected in the supernatant under cellulose-excess conditions (Table 2). However, neither glucose nor celodextrins with longer chains than cellotriose could be assayed by enzymatic, high-pressure liquid chromatography, and thin-layer chromatography techniques. Taking these compounds into account, the global carbon balance was found to be in the range of 95.3 to 97.4% (Table 2).

Cellulose degradation in continuous culture at high substrate concentrations. *C. cellulolyticum* was cultivated in cellulose excess with 18.1 g of cellulose liter⁻¹ at different D values, which ranged from 0.026 to 0.080 h⁻¹ (Table 3). From the lowest to the highest D value tested, the cell density at steady state decreased while the observed cell yield ($Y_{X/S}$) increased (Table 3). The Pirt plot of these data ($r^2 = 0.992$) permitted determination of a $Y_{X/S}^{max}$ of 40.6 g of biomass mol of hexose eq consumed⁻¹ and a maintenance coefficient (m) of 1.0 mmol of hexose eq g of cells⁻¹ h⁻¹. The percentage of nonadherent cells remained very low, ranging from 7.2 to 2.7% (Fig. 2a). In a cellulose-limited chemostat (i.e., 3.7 g of cellulose liter⁻¹), however, the percentage of planktonic cells decreased from 59.6 to 21.0% as D increased from 0.027 to 0.083 h⁻¹ and was always much higher than in cellulose saturation (Fig. 2a). The proportion of undegraded cellulose was much lower in cellulose limitation than under cellulose-sufficient conditions; with increasing D it rose from 49.6 to 79.0% and from 78.6 to 94.7%, respectively (Fig. 2b). With this culture condition, *C. cellulolyticum* always left undigested cellulose. Plots of S_R/S_0 versus t_R ($t_R = 1/D$) were linear, with a first-order rate constant of 0.008 h⁻¹ determined from linear regression of the data ($r^2 = 0.996$) (Fig. 2b).

Acetate was always the predominant fermentation end product (Table 3), with the ratio of acetate to ethanol increasing from 2.94 to 3.80. Lactate was also significantly produced, while extracellular pyruvate did not exceed 0.8% of the $q_{pyruvate}$. Another part of the carbon was oriented towards amino acid, protein, and biomass (Table 3). These compounds were taken into account in addition to fermentative end products and celodextrins for calculation of carbon recovery, which then ranged between 92.9 and 97.4%.

Kinetics analysis of microbial cellulose conversion under cellulose-sufficient conditions. The carbon flow in the central metabolic pathway of *C. cellulolyticum* (Fig. 1) grown in cellulose-sufficient continuous culture is compiled in Table 4. With increasing D , the proportion of carbon flowing down the catabolite declined from 81.2 to 69.1%, while it was enhanced through biosynthesis pathways from 16.3 to 23.8%. In parallel, q_{G6P} gradually rose, but this increase represented a decreasing proportion of the original carbon. As a result, the G6P pool slowly declined (Fig. 3) as D rose, and when expressed in term of turnover this pool increased from 22.1 to 41.7 h⁻¹. The proportion of carbon directed towards exopolysaccharide and

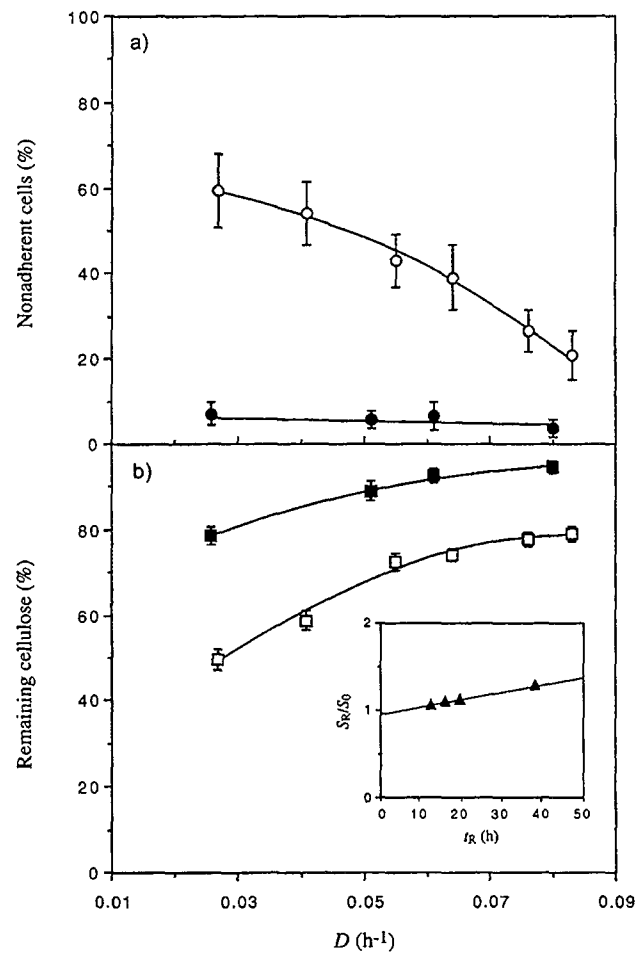


FIG. 2. Percentage of nonadherent cells (a) and proportion of undigested cellulose (b) in cellulose-limited (i.e., 3.7 g liter⁻¹) (○, □) and in cellulose-excess (i.e., 18.1 g liter⁻¹) (●, ■) continuous culture of *C. cellulolyticum*. Error bars indicated standard deviations. Inset, correlation between S_R/S_0 and t_R under cellulose-sufficient conditions.

glycogen was low at a D of 0.026 h⁻¹ and reached 5.7 and 1.4%, respectively, with the highest D tested (Table 4). In contrast, the q_{G1P} towards celodextrin declined from 2.0% to nil at a D of 0.080 h⁻¹, since no celodextrin could then be detected (Table 4). The G1P flux through phosphoglucomutase varied from 60.4 to 55.9% (Table 4). G1P then accumulated with increasing D (Fig. 3), which resulted in the turnover decreasing from 46.4 to 15.4 h⁻¹. The proportion of the carbon flux towards phosphoglucomutase declined, and the G1P, which was directed towards celodextrin at low D values, was rerouted towards glycogen and exopolysaccharide at higher D values. The percentage of carbon directed towards the fermentative end products declined as D rose (Table 4). One part of the flux was converted to acetyl coenzyme A (acetyl-CoA), i.e., from 50.9 to 45.2%. In the same time, $q_{acetate}$ and $q_{ethanol}$ increased, but when expressed as a percentage of $q_{cellulose}$, the two fluxes declined (Table 4). Another part of the carbon flowing down glycolysis was oriented towards the lactate production pathway. As D was enhanced, lactate production decreased, as did the pyruvate leak.

TABLE 4. Carbon fluxes under cellulose-saturated conditions with *C. cellulolyticum*

| Carbon flow ^a | Results obtained at a <i>D</i> value (h ⁻¹) of: | | | | | | | |
|---|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|
| | 0.026 | | 0.051 | | 0.061 | | 0.080 | |
| | meqC g of cells ⁻¹ h ⁻¹ | % | meqC g of cells ⁻¹ h ⁻¹ | % | meqC g of cells ⁻¹ h ⁻¹ | % | meqC g of cells ⁻¹ h ⁻¹ | % |
| <i>q</i> _{cellulose} | 9.91 | 100.0 | 13.98 | 100.0 | 15.20 | 100.0 | 17.44 | 100.0 |
| <i>q</i> _{G1P} | 6.24 | 63.0 | 8.80 | 63.0 | 9.57 | 63.0 | 10.98 | 63.0 |
| <i>q</i> _{cellodextrin} | 0.34 | 3.5 | 0.41 | 3.0 | 0.37 | 2.6 | ND ^b | ND |
| <i>q</i> _{G1P towards cellodextrin} | 0.20 | 2.0 | 0.24 | 1.7 | 0.21 | 1.5 | ND | ND |
| <i>q</i> _{β-glucan towards cellodextrin} | 0.15 | 1.5 | 0.18 | 1.3 | 0.16 | 1.1 | ND | ND |
| <i>q</i> _{glycogen} | 0.05 | 0.5 | 0.12 | 0.9 | 0.22 | 1.4 | 0.24 | 1.4 |
| <i>q</i> _{exopolysaccharide} | 0.01 | 0.1 | 0.10 | 0.7 | 0.55 | 3.6 | 0.99 | 5.7 |
| <i>q</i> _{glucose} | 3.67 | 37.0 | 5.18 | 37.0 | 5.63 | 37.0 | 6.46 | 37.0 |
| <i>q</i> _{phosphoglucomutase} | 5.99 | 60.4 | 8.34 | 59.7 | 8.59 | 56.5 | 9.75 | 55.9 |
| <i>q</i> _{G6P} | 9.66 | 97.5 | 13.52 | 96.7 | 14.22 | 93.5 | 16.21 | 92.9 |
| <i>q</i> _{biosynthesis} | 1.61 | 16.3 | 2.88 | 20.6 | 3.22 | 21.2 | 4.16 | 23.8 |
| <i>q</i> _{pyruvate} | 8.04 | 81.2 | 10.64 | 76.1 | 11.00 | 72.3 | 12.05 | 69.1 |
| <i>q</i> _{acetyl-CoA} | 5.05 | 50.9 | 6.82 | 48.8 | 7.11 | 46.8 | 7.89 | 45.2 |
| <i>q</i> _{lactate} | 0.41 | 4.2 | 0.35 | 2.5 | 0.29 | 1.9 | 0.18 | 1.0 |
| <i>q</i> _{extracellular pyruvate} | 0.06 | 0.6 | 0.05 | 0.4 | 0.05 | 0.3 | 0.04 | 0.2 |
| <i>q</i> _{carbon dioxide} | 2.52 | 25.5 | 3.41 | 24.4 | 3.56 | 23.4 | 3.95 | 22.6 |
| <i>q</i> _{ethanol} | 1.28 | 12.9 | 1.50 | 10.7 | 1.52 | 10.0 | 1.64 | 9.4 |
| <i>q</i> _{acetate} | 3.77 | 38.0 | 5.33 | 38.1 | 5.59 | 36.8 | 6.25 | 35.8 |

^a Carbon flows were calculated as specified in Materials and Methods and are diagrammed in Fig. 1.

^b ND, not determined.

Relationships between carbon flow and enzymatic activities, energetic balance, and redox balance. In vitro GAPDH, PFO, ADH, and AK activities were higher under growth conditions giving higher in vivo specific production rates (Table 5). For LDH, however, the specific enzyme activities decreased with *D*, which was correlated with the in vivo lactate production rate. A ratio of specific enzyme activity to metabolic flux (*R*) (11, 27) was then calculated; *R* was higher than 1 for all enzymes tested. Therefore, these enzymes were not limiting with respect to the carbon flow, and thus fluxes were determined more by the concentration of substrate available than by the enzyme activity (12, 26).

As *D* increased, *q*_{ATP} was enhanced while the stoichiometry

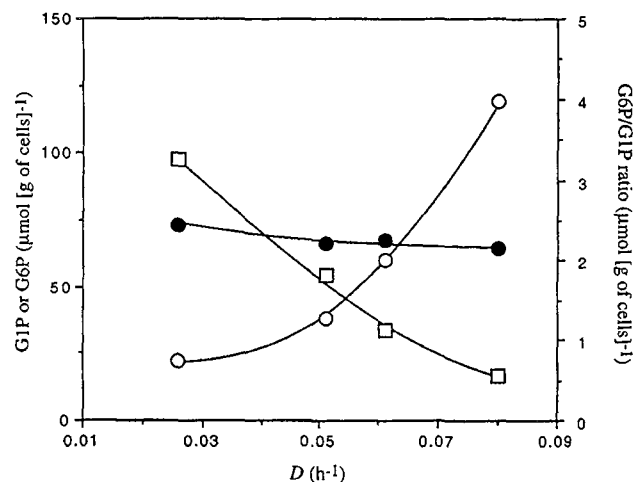


FIG. 3. G1P (○), G6P (●), and G6P/G1P ratio (□) as a function of dilution rate in cellulose-sufficient continuous culture of *C. cellulolyticum*.

of ATP generated over fermented cellulose, i.e., ATP-Eff, declined from 2.66 to 2.37 (Table 6). Thus, the acetate production could not compensate for the ATP loss per hexose eq fermented due to the decrease of both ethanol and lactate production. A mean value of 0.77 was obtained for the adenylate energy charge (Table 6). The apparent energetic yield increased with *D* (Table 6), and from a Pirt plot of the data (*r*² = 0.988) a *Y*_{ATP}^{max} of 19.4 g of cells mol of ATP⁻¹ and an *m*_{ATP} of 3.1 mmol of ATP g of cells⁻¹ h⁻¹ were determined.

Calculating the coenzyme balance, it could first be observed that both *q*_{NADH produced} and *q*_{NADH used} increased with *D*, as did the *q*_{NADH produced}/*q*_{NADH used} ratio (Table 7). This excess of produced NADH correlated with increases of both the H₂/CO₂ ratio, which was always higher than 1, and the *q*_{NADH-Fd}. These results suggested that the intracellular NADH/NAD⁺ ratio was maintained by the NADH-Fd reductase and hydrogenase, since these interconnected enzymatic activities can oxidize NADH via H₂ production (18–20). The O/R, determined from the gas production ratio and fermentative end product concentration, was very close to 1 and indicated an efficient reoxidation of NADH via H₂ production in addition to carbon fermentative pathways (11).

DISCUSSION

A continuous culture system in which the feed rate is set externally is generally regarded as a chemostat if cell growth is also limited by a selected nutrient(s) (21, 52). Upon increasing the carbon substrate concentration in the feed reservoir, cellulose was no longer the growth-limiting nutrient at and above 7.6 g of cellulose liter⁻¹, and all other nutrients appeared in excess (10, 20). Growth under substrate excess generally results in oscillations and hysteresis (23, 24, 37, 52), but such phenomena did not occur, since steady states of both residual cellulose concentration and biomass monitored during cell culture could

TABLE 5. Specific enzymatic activities in *C. cellulolyticum* cell extract at steady-state growth under cellulose-excess conditions

| Enzyme | Results obtained at <i>D</i> value (h ⁻¹) of: | | | | | | | |
|---------------------|---|-----------------------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| | 0.026 | | 0.051 | | 0.061 | | 0.080 | |
| | Sp act ^a | <i>R</i> ^b | Sp act | <i>R</i> | Sp act | <i>R</i> | Sp act | <i>R</i> |
| GAPDH (EC 1.2.1.12) | 1.47 ± 0.22 | | 2.87 ± 0.38 | | 3.24 ± 0.41 | | 3.91 ± 0.47 | |
| LDH (EC 1.1.1.27) | 0.25 ± 0.06 | 80.8 | 0.22 ± 0.03 | 82.8 | 0.16 ± 0.04 | 74.6 | 0.11 ± 0.05 | 81.9 |
| PFO (EC 1.2.7.1) | 0.62 ± 0.07 | 10.9 | 0.72 ± 0.06 | 9.4 | 0.89 ± 0.09 | 11.1 | 0.95 ± 0.11 | 10.7 |
| AK (EC 2.7.2.1) | 0.31 ± 0.04 | 7.3 | 0.66 ± 0.08 | 11.0 | 1.03 ± 0.12 | 16.4 | 1.33 ± 0.19 | 18.9 |
| ADH (EC 1.1.1.1) | 0.23 ± 0.03 | 16.0 | 0.32 ± 0.04 | 19.0 | 0.39 ± 0.03 | 22.8 | 0.45 ± 0.06 | 24.4 |

^a Expressed in micromoles minute⁻¹ milligram of protein⁻¹. Results are means and standard deviations.

^b *R*, ratio of specific enzymatic activity to metabolic flux through the considered metabolic path; flux was expressed as micromoles milligram of protein⁻¹ minute⁻¹.

be maintained (39). Then, as previously observed with cellobiose (20), a stable carbon excess continuous culture could be imposed on *C. cellulolyticum*. From studies of growth of *C. cellulolyticum* in cellobiose-fed continuous culture in a stepwise fashion (18) and in cellulose batch culture with a reinoculation mode (10), it was demonstrated that growth arrest was not associated with the production of extracellular toxic compounds, and thus it is unlikely that the steady state of the present continuous culture could be maintained by such growth inhibition. Yet, comparing the maximum growth yields and maximum energetic yield obtained under cellulose-sufficient conditions (i.e., $Y_{X/S}^{max} = 40.6$ g of biomass mol of hexose eq consumed⁻¹ and $Y_{ATP}^{max} = 19.4$ g of cells mol of ATP⁻¹) to those resulting from cellulose limitation (i.e., $Y_{X/S}^{max} = 50.5$ g of biomass mol of hexose eq consumed⁻¹ and $Y_{ATP}^{max} = 30.3$ g of cells mol of ATP⁻¹ [11]), it could be observed that both maximum yields were lowered in the presence of a cellulose excess. The decline of these yields indicated that an uncoupling growth phenomenon had occurred; it also took place with the rise in lactate production accompanied by a pyruvate leak. Thus, the growth stagnation was certainly related to an accumulation of an intracellular inhibitory compound(s) (18); intracellular inhibition could furthermore explain the establishment of a steady state under the condition of an excess of all nutrients (52).

The understanding of microbial cellulose metabolism is of both ecological and biotechnological interest. Cellulose degradation plays a key role in the global carbon cycle (28, 29, 51) and is a promising strategy in consolidated bioprocessing for the production of biochemical compounds (25, 31–34). So far, however, very few studies have been devoted to cellulose digestion by cellulolytic bacteria under substrate-saturated conditions (38, 40, 48). Under cellulose-sufficient culture condi-

tions, cellulose digestion always follows first-order kinetics, where *k* (0.008 h⁻¹) was much lower than under cellulose-limited conditions (0.046 h⁻¹) (11). Once cellulose-saturated conditions were attained, approximately the same amount of cellulose was digested, since the biomass concentration at steady state stagnated. Therefore, *k* will vary for each cellulose concentration used with this growth condition, since cellulose degradation will follow first-order kinetics with respect to the remaining cellulose concentration (44). Opposite to what was observed with cellulose limitation (11), the lactate-ethanol production was lowered as *D* rose and had to be balanced by dihydrogen production via the NADH-Fd reductase, which led to an increased H₂/CO₂ ratio. The acetate/ethanol ratio was always higher than 1, but in contrast to the case with cellulose limitation, it increased with *D* (11). The specific lactate production rate as well as the pyruvate leak decreased with increasing *D* but always remained higher than in a cellulose-limited chemostat (11). The *R* values for LDH were around 80.0 and were not as high as with cellulose limitation, where *R* could reach 434.2 (11). From the G1P metabolic node, cello-dextrins were produced and represented up to 3.5% of the carbon uptake at the lowest *D* value tested. G1P was rerouted towards exopolysaccharide and glycogen as *D* rose; as in cellulose limitation, these biosyntheses could be adjusted as a function of carbon flux. Such glycogen turnover was recently observed with *Fibrobacter succinogenes* on cellulose (7, 14). A concomitant decrease of the percentage of carbon flowing through $q_{\text{phosphoglucomutase}}$, q_{G6P} , and q_{pyruvate} in favor of biosynthesis pathways could explain the relative drop in lactate production as *D* increased. Compared to that in cellulose-limited chemostats, the proportion of unattached cells was low. With cellulose limitation the available surface area is saturated by bacteria, while under cellulose-sufficient conditions the cel-

TABLE 6. Energetic balance in cellulose-saturated continuous culture of *C. cellulolyticum*

| Parameter (unit) | Results ^a obtained at a <i>D</i> value (h ⁻¹) of: | | | |
|--|--|-------------|-------------|-------------|
| | 0.026 | 0.051 | 0.061 | 0.080 |
| ATP (μmol g of cells ⁻¹) | 2.84 ± 0.15 | 2.31 ± 0.11 | 2.17 ± 0.19 | 1.89 ± 0.10 |
| ADP (μmol g of cells ⁻¹) | 1.41 ± 0.08 | 1.21 ± 0.06 | 1.29 ± 0.09 | 1.25 ± 0.05 |
| AMP (μmol g of cells ⁻¹) | 0.32 ± 0.05 | 0.27 ± 0.03 | 0.11 ± 0.01 | 0.25 ± 0.02 |
| Energetic charge | 0.78 | 0.77 | 0.79 | 0.74 |
| q_{ATP} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 4.39 | 5.98 | 6.23 | 6.89 |
| ATP-Eff | 2.66 | 2.57 | 2.46 | 2.37 |
| Y_{ATP} (g of cells mol of ATP ⁻¹) | 5.9 | 8.5 | 9.8 | 11.6 |

^a Values are the averages for samples at steady-state ± standard deviations. Values without standard deviations were determined with an average accuracy of ±10%.

TABLE 7. Redox balance of *C. cellulolyticum* at steady state under cellulose-sufficient conditions

| Parameter (unit) | Results ^a obtained at a <i>D</i> value (h ⁻¹) of: | | | |
|--|--|--------------|--------------|--------------|
| | 0.026 | 0.051 | 0.061 | 0.080 |
| NADH (μmol g of cells ⁻¹) | 6.67 ± 1.36 | 7.56 ± 1.59 | 5.16 ± 1.09 | 8.12 ± 1.62 |
| NAD ⁺ (μmol g of cells ⁻¹) | 11.31 ± 2.33 | 12.01 ± 2.43 | 11.40 ± 2.25 | 12.32 ± 2.44 |
| NADH/NAD ⁺ ratio | 0.59 | 0.63 | 0.45 | 0.66 |
| <i>q</i> _{NADH produced} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 2.68 | 3.55 | 3.67 | 4.02 |
| <i>q</i> _{NADH used} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 1.42 | 1.61 | 1.61 | 1.70 |
| <i>q</i> _{NADH-Fd} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 1.26 | 1.93 | 2.05 | 2.32 |
| <i>q</i> _{NADH produced} / <i>q</i> _{NADH used} ratio | 1.89 | 2.20 | 2.27 | 2.36 |
| H ₂ /CO ₂ ratio | 1.43 | 1.55 | 1.61 | 1.67 |
| O/R | 1.03 | 1.01 | 0.98 | 0.96 |

^a Values are the averages for samples at steady state ± standard deviations. Values without standard deviations were determined with an average accuracy of ±10%.

lulose surface area is largely accessible for bacterial adhesion (10, 13). This was correlated with a higher cellulose digestion rate reflected by higher *q*_{cellulose} under substrate excess conditions, since most of the cells adhered to cellulose fibers and thus participated directly in cellulose digestion. While cello-dextrin was undetectable with cellulose limitation (11), cellobiose and cellotriose were detected here in the supernatant; such a finding was certainly related to a reversible phosphor-ylase reaction (1, 2, 30, 35, 36, 47, 50). Under cellobiose-sufficient conditions (17, 20), only cellotriose was detected, but the present results suggest that cellobiose could also be syn-thesized de novo during cell growth on cellobiose.

Previous reports on experiments with cellobiose stated that the adhesion-colonization phase of the process of cellulose digestion by *C. cellulolyticum* (15, 16) corresponded to a carbon-sufficient period (20). It was thus argued that a carbon flow of as high as 5.14 mmol of hexose eq g of cells⁻¹ could be attained with cellulose as a substrate (20). With cellulose saturation, however, the entering carbon flow remained lower than expected, i.e., 2.91 mmol of hexose eq g of cells⁻¹ h⁻¹. The NADH/NAD⁺ ratio was always lower than 1 on cellulose, whereas a ratio of as high as 1.51 was obtained with cellobiose excess (20); this result was most probably related to a higher carbon consumption rate which led to rate-limiting fluxes through ethanol and dihydrogen production pathways on cellobiose. Thus, the proper NADH/NAD⁺ ratio was maintained only when ethanol and lactate production complemented the path towards H₂ production via NADH-Fd reductase activity. With a carbon excess, free amino acid could account for 15.4% of the cellobiose fermented (20), against a maximum of 5.8% on cellulose, while exopolysaccharide represented up to 38.1% of the cellobiose consumed (20) and there was a maximum of only 5.7% with cellulose as the substrate. It thus appeared that some of the general metabolic trends associated with carbon-sufficient conditions, such as (i) the ATP/ADP ratio always being higher than 1, (ii) the elevated production of lactate at a low *D*, and (iii) the concomitant increase of *q*_{ethanol}, *q*_{NADH-Fd}, *q*_{NADH produced}/*q*_{NADH used}, NADH/NAD⁺, and H₂/CO₂ as *D* rose and some other regulations of bacterial metabolism, were not observed on cellulose compared to cellobiose. Even if cellulose degradation must be considered as a microbial process rather than a purely enzymatic event, the strong influence of the cellulosome on the entering carbon flow must be taken into account (10, 11). The study of *C. cellulolyticum* catabolism with soluble glucide allowed the demonstration of bacterial

metabolic limitation, but this response should be interpreted as deregulation of the metabolism. All of these results demon-strate that *C. cellulolyticum* was able to correctly regulate and optimize carbon metabolism in limited and saturated condi-tions using a substrate more representative of its natural envi-ronment, i.e., cellulose (12).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Commission of European Commu-nities FAIR program (contract CT950191 [DG12SSMA]) and by the program Agrice (contract 9701041).

We thank Anne-Cécile Aubry and Guy Raval for excellent technical assistance and Edward McRae for correcting the English and for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Alexander, J. K. 1972. Cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermo-cellum*. *Methods Enzymol.* 28:944-948.
- Alexander, J. K. 1972. Cellodextrin phosphorylase from *Clostridium thermo-cellum*. *Methods Enzymol.* 28:948-953.
- Bayer, E. A., H. Chanzy, R. Lamed, and Y. Shoham. 1998. Cellulose, cellu-lases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:548-557.
- Bayer, E. A., and R. Lamed. 1992. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation* 3:171-188.
- Béguin, P., and J. P. Aubert. 1996. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:25-58.
- Belaich, J. P., C. Tardiff, A. Belaich, and C. Gaudin. 1997. The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. *J. Biotechnol.* 57:3-14.
- Bibollet, X., N. Bosc, M. Matulova, A. M. Delort, G. Gaudet, and E. Forano. 2000. ¹³C and ¹H NMR study of cellulose metabolism by *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Biotechnol.* 77:37-47.
- Boisset, C., H. Chanzy, B. Henrissat, R. Lamed, Y. Shoham, and E. A. Bayer. 1999. Digestion of crystalline cellulose substrates by *Clostridium thermocel-lum* cellulosome: structural and morphological aspects. *Biochem. J.* 340:829-835.
- Desai, R. P., L. K. Nielsen, and E. T. Papoutsakis. 1999. Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear con-straints. *J. Biotechnol.* 71:191-205.
- Desvaux, M., E. Guedon, and H. Petitdemange. 2000. Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2461-2470.
- Desvaux, M., E. Guedon, and H. Petitdemange. 2001. Carbon flux distribu-tion and kinetics of cellulose fermentation in steady-state continuous cul-tures of *Clostridium cellulolyticum* on a chemically defined medium. *J. Bacteriol.* 183:119-130.
- Desvaux, M., and H. Petitdemange. 2001. Flux analysis of the metabolism of *Clostridium cellulolyticum* grown in cellulose-fed continuous culture on a chemically defined medium under ammonium-limited conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3846-3851.
- Fields, M. W., and J. B. Russell. 2000. *Fibrobacter succinogenes* S85 ferments ball-milled cellulose as fast as cellobiose until cellulose surface area is lim-iting. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:570-574.
- Gaudet, G., E. Forano, G. Dauphin, and A. M. Delort. 1992. Futile cycling of glycogen in *Fibrobacter succinogenes* as shown by in situ ¹H-NMR and ¹³C-NMR investigation. *Eur. J. Biochem.* 207:155-162.
- Gelhay, E., A. Gehin, and H. Petitdemange. 1993. Colonization of crystal-

- line cellulose by *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. Appl. Environ. Microbiol. 59:3154-3156.
16. Gelhaye, E., H. Petitdemange, and R. Gay. 1993. Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose. J. Bacteriol. 175:3452-3458.
 17. Guedon, E., M. Desvaux, and H. Petitdemange. 2000. Kinetic analysis of *Clostridium cellulolyticum* carbohydrate metabolism: importance of glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate branch points for distribution of carbon fluxes inside and outside cells as revealed by steady-state continuous culture. J. Bacteriol. 182:2010-2017.
 18. Guedon, E., M. Desvaux, S. Payot, and H. Petitdemange. 1999. Growth inhibition of *Clostridium cellulolyticum* by an inefficiently regulated carbon flow. Microbiology 145:1831-1838.
 19. Guedon, E., S. Payot, M. Desvaux, and H. Petitdemange. 1999. Carbon and electron flow in *Clostridium cellulolyticum* grown in chemostat culture on synthetic medium. J. Bacteriol. 181:3262-3269.
 20. Guedon, E., S. Payot, M. Desvaux, and H. Petitdemange. 2000. Relationships between cellobiose catabolism, enzyme levels and metabolic intermediates in *Clostridium cellulolyticum* grown in a synthetic medium. Biotechnol. Bioeng. 67:327-335.
 21. Gottschal, J. C. 1992. Continuous culture, p. 559-572. In J. Lederberg (ed.), Encyclopedia of microbiology, vol. 1. Academic Press, New York, N.Y.
 22. Gottschalk, G. 1985. Bacterial metabolism. Springer-Verlag, New York, N.Y.
 23. Harrison, D. E. F., and H. H. Topiwala. 1974. Transient and oscillatory states of continuous culture. p. 168-219. In T. H. Ghose and A. Fiechter (ed.), Advanced biochemical engineering, vol. 3. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
 24. Hjortso, M. A., and J. Nielsen. 1994. A conceptual model of autonomous oscillations in microbial cultures. Chem. Eng. Sci. 49:1083-1095.
 25. Hogsett, D. A., H. J. Alm, T. D. Bernardez, C. R. South, and L. R. Lynd. 1992. Direct microbial conversion: prospects, progress, and obstacles. Appl. Biochem. Biotechnol. 34-35:527-541.
 26. Holms, H. 1986. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. Curr. Top. Cell. Regul. 28:69-105.
 27. Holms, H. 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. 19:85-116.
 28. Leschine, S. B. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. Annu. Rev. Microbiol. 49:399-426.
 29. Ljungdahl, L. G., and K. E. Eriksson. 1985. Ecology of microbial cellulose degradation. Adv. Microb. Ecol. 8:237-299.
 30. Lou, J., K. A. Dawson, and H. J. Strobel. 1997. Cellobiose and cellobiose metabolism by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. Curr. Microbiol. 35:221-227.
 31. Lynd, L. R. 1996. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environments, and policy. Annu. Rev. Energy Environ. 21:403-465.
 32. Lynd, L. R., H. E. Grethlein, and R. H. Wolkin. 1989. Fermentation of cellulosic substrates in batch and continuous culture of *Clostridium thermocellum*. Appl. Environ. Microbiol. 55:3131-3139.
 33. Lynd, L. R., J. H. Cushman, R. J. Nichols, and C. E. Wyman. 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. Science 251:1318-1323.
 34. Lynd, L. R., C. E. Wyman, and T. U. Gerngross. 1999. Biocommodity engineering. Biotechnol. Prog. 15:777-793.
 35. Matheron, C., A. M. Delort, G. Gaudet, and E. Forano. 1996. Simultaneous but differential metabolism of glucose and cellobiose in *Fibrobacter succinogenes* cells, studied by in vivo ¹³C NMR. Can. J. Microbiol. 42:1091-1099.
 36. Matheron, C., A. M. Delort, G. Gaudet, and E. Forano. 1998. In vivo ¹³C NMR study of glucose and cellobiose metabolism by four cellulolytic strains of the genus *Fibrobacter*. Biodegradation 9:451-461.
 37. Menzel, K., A. P. Zeng, H. Biebl, and W. D. Deckwer. 1996. Kinetic, dynamic and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture. 1. The phenomena and characterization of oscillation and hysteresis. Biotechnol. Bioeng. 52:549-560.
 38. Mitchell, W. J. 1998. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. Adv. Microb. Physiol. 39:31-130.
 39. Monod, J. 1950. La technique de culture continue théorie et applications. Ann. Inst. Pasteur 79:390-410.
 40. Ohmiya, K., K. Nokura, and S. Shimizu. 1983. Enhancement of cellulose degradation by *Ruminococcus albus* at high cellulose concentration. J. Ferment. Technol. 61:25-30.
 41. Pages, S., A. Belaich, H. P. Fierobe, C. Tardif, C. Gaudin, and J. P. Belaich. 1999. Sequence analysis of scaffolding protein CipC and ORFXp, a new cohesin-containing protein in *Clostridium cellulolyticum*: comparison of various cohesin domains and subcellular localization of ORFXp. J. Bacteriol. 181:1801-1810.
 42. Pages, S., A. Belaich, C. Tardif, C. Reverbel-Leroy, C. Gaudin, and J. P. Belaich. 1996. Interaction between the endoglucanase CelA and the scaffolding protein CipC of the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome. J. Bacteriol. 178:2279-2286.
 43. Pages, S., L. Gal, A. Belaich, C. Gaudin, C. Tardif, and J. P. Belaich. 1997. Role of scaffolding protein CipC of *Clostridium cellulolyticum* in cellulose degradation. J. Bacteriol. 179:2810-2816.
 44. Pavlostathis, S. G., T. L. Miller, and M. J. Wolin. 1988. Kinetics of insoluble cellulose fermentation by continuous cultures of *Ruminococcus albus*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2660-2663.
 45. Petitdemange, E., F. Caillet, J. Giallo, and C. Gaudin. 1984. *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic mesophilic species from decayed grass. Int. J. Syst. Bacteriol. 34:155-159.
 46. Pirt, S. J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, United Kingdom.
 47. Russell, J. B. 1985. Fermentation of cellobioses by cellulolytic and non-cellulolytic rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 49:572-576.
 48. Russell, J. B. 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. J. Anim. Sci. 76:1955-1963.
 49. Weimer, P. J., Y. Shi, and C. L. Odt. 1991. A segmented gas/liquid delivery system for continuous culture of microorganisms on insoluble substrates and its use for growth of *Ruminococcus flavefaciens* on cellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:178-183.
 50. Wells, J. E., J. B. Russell, Y. Shi, and P. J. Weimer. 1995. Cellodextrin efflux by the cellulolytic ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* and its potential role in the growth of nonadherent bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61:1757-1762.
 51. Wolin, M. J., and T. L. Miller. 1987. Bioconversion of organic carbon to CH₄ and CO₂. Geomicrobiol. J. 5:239-259.
 52. Zeng, A. P. 1999. Continuous culture, p. 151-164. In A. L. Demain and J. E. Davies (ed.), Manual of industrial microbiology and biotechnology. ASM Press, Washington, D.C.

III. Discussion

Une culture continue dans laquelle la vitesse d'alimentation est établie de manière externe est qualifiée de chémostat, si la croissance cellulaire est limitée par un nutriment (Zeng, 1999). Une croissance en culture continue dans des conditions d'excès de tous les nutriments ne peut plus *stricto sensu* être qualifiée de chémostat. En augmentant continuellement la concentration en substrat carboné dans le réservoir d'alimentation, la source de carbone n'est plus le nutriment limitant de la croissance à partir d'un certain seuil. Si aucun autre nutriment ne devient un facteur limitant de la croissance, de telles conditions entraînent généralement des oscillations périodiques de la biomasse (Harrison et Topiwala, 1974 ; Hjortso et Nielsen, 1994 ; Menzel *et al.*, 1996). Cependant, comme sur cellobiose (Guedon *et al.*, 2000b), un état stationnaire a pu être atteint puisqu'une concentration résiduelle stable en cellulose ainsi qu'une densité cellulaire stable ont pu être obtenues.

A partir des observations faites en cultures continues sur (Guedon *et al.*, 1999a) et en cultures discontinues sur cellulose (Desvaux *et al.*, 2000), il a pu être démontré que l'arrêt de croissance n'était pas lié à des composés extracellulaires toxiques mais à un flux carboné élevé entraînant une excrétion de pyruvate. En comparant les Y_{ATP}^{max} et $Y_{X/S}^{max}$, il a pu être constaté que ceux obtenus en conditions de cellulose limitante étaient plus faibles que ceux obtenus en conditions de cellulose saturante. Ce déclin simultané indique un phénomène de découplage de la croissance associé à une production de lactate et à une excrétion de pyruvate plus importantes en conditions de cellulose saturante qu'en conditions de cellulose limitante. Ainsi l'établissement d'un état stationnaire dans ces conditions de saturation de tous les nutriments s'expliquerait par un phénomène d'inhibition intracellulaire (Zeng, 1999).

Les vitesses spécifiques de consommation de la cellulose plus élevées en conditions de cellulose saturante qu'en conditions de cellulose limitante s'expliqueraient par le pourcentage plus important en conditions de cellulose saturante des cellules adhérees à la cellulose qui participent alors directement à la digestion du substrat insoluble. La production de lactate et l'excrétion de pyruvate dans le milieu extracellulaire diminue lorsque le taux de dilution augmente mais reste toujours supérieures à celles qui étaient observées en conditions de cellulose limitante (Desvaux *et al.*, 2001b). Une diminution concomitante des pourcentages des flux carbonés dirigés vers le q_{PGM} , q_{G6P} et $q_{pyruvate}$ pourrait expliquer la chute relative de production du lactate aux taux de dilution plus élevés. Contrairement à ce qui était observé en limitation de cellulose, la production de lactate et d'éthanol diminue quand le taux de dilution augmente. Le flux électronique est alors équilibré par la production d'hydrogène *via* la NADH-Fd oxydoréductase et l'hydrogénase conduisant à une augmentation du rapport H_2/CO_2 .

Des caractéristiques métaboliques communes aux conditions de carbone saturant, que ce soit

sur cellobiose ou sur cellulose, ont été observées telles que :

- des rapports ATP/ADP toujours supérieurs à 1,
- une production importante de pyruvate aux faibles D ,
- ou encore une augmentation concomitante des $q_{\text{éthanol}}$, $q_{\text{NADH-Fd}}$, des rapports $q_{\text{NADH produit}}/q_{\text{NADH utilisé}}$, NADH/NAD^+ et H_2/CO_2 quand le taux de dilution augmente (Guedon *et al.*, 2000b).

Les études précédentes sur cellobiose statuaient que selon le modèle de la croissance de *Clostridium cellulolyticum* sur cellulose (Gehin *et al.*, 1996a ; Gelhaye *et al.*, 1993), la phase d'adhésion et de colonisation correspondait à des conditions de cellobiose saturant (Guedon *et al.*, 2000b). Il était donc supposé que des flux carbonés entrants aussi élevés que 5,14 mmol d'hexoses équivalents.(gramme de biomasse)⁻¹.h⁻¹ pouvaient être atteints sur cellulose. Cependant, en conditions de cellulose saturante, le flux carboné maximal obtenu n'est que de 2,91 mmol d'hexoses équivalent.(g de biomasse)⁻¹.h⁻¹. Dans ces conditions, le rapport NADH/NAD^+ était toujours inférieur à 1, indiquant une régulation correcte du flux des électrons. La présence d'acides aminés et d'exopolysaccharides était considérée précédemment comme le résultat de débordements métaboliques permettant l'évacuation de l'excès de carbone et indiquait les limitations du métabolisme de *Clostridium cellulolyticum* (Guedon *et al.*, 2000b). Cependant, la proportion du flux carboné dirigée vers ces composés est bien plus limitée en conditions de cellulose saturante qu'en conditions de cellobiose saturant. Ainsi certaines régulations qui ne sont pas mises en place sur cellulose sont associées à des flux carbonés entrants plus élevés sur cellobiose que sur cellulose. Comme précédemment en conditions de cellulose limitante (Desvaux *et al.*, 2001b), ces observations devraient être interprétées comme des dérégulations du métabolisme.

F. Etude du catabolisme de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum* en chémostat : influence de la limitation en azote sur la distribution du flux carboné

I. Introduction

Dans les environnements naturels, des conditions de carence azotée sont très fréquemment rencontrées par les bactéries (Leschine *et al.*, 1988 ; Leschine et Canale-Parola, 1989). Par ailleurs, les composés lignocellulosiques qui contiennent de fortes teneurs en carbone, sont généralement plus pauvres en azote. Ainsi, ces conditions jouent vraisemblablement un rôle primordial dans la dégradation de la cellulose (Leschine, 1995).

Une étude précédente menée sur cellobiose en conditions d'azote limitant a montré l'importance des points de branchement du G1P et du G6P connectés par la phosphoglucomutase dans la distribution des flux carbonés à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule (Guedon *et al.*, 2000a). Le flux de cellobiose entrant alimentait à parts égales le pool de G1P et de G6P grâce à l'activité cellobiose phosphorylase. Le G6P se dirigeait vers la glycolyse tandis que le flux carboné issu du G1P s'orientait vers la formation d'exopolysaccharides, de glycogène ou vers la glycolyse *via* la phosphoglucomutase. A mesure que le flux carboné entrant augmentait, il apparaissait que la phosphoglucomutase devenait une étape limitante conduisant à une réorientation métabolique d'abord vers la production de glycogène puis vers celle d'exopolysaccharides. Le glycogène jouerait donc un rôle de régulation du flux carboné en stockant de façon transitoire du carbone et en le redistribuant au besoin dans les voies métaboliques centrales (Guedon *et al.*, 2000a).

Les études précédentes menées en conditions de cellulose limitante et saturante ont montré qu'il fallait nuancer certains résultats précédemment obtenus sur cellobiose, en particulier aux flux carbonés élevés (Desvaux *et al.*, 2001b, 2001c). En effet, bien que le cellobiose ait permis de mettre en exergue les limitations du métabolisme bactérien, certaines de ces réponses doivent être interprétées comme des artefacts de laboratoire puisque ces dérégulations métaboliques sont imputables à l'utilisation d'une cellodextrine soluble, le cellobiose dont la nature physique reste très éloignée de la cellulose native. Ces résultats indiquent que *Clostridium cellulolyticum* est une bactérie adaptée à un substrat insoluble de type cellulosique et à des flux métaboliques plus faibles que ceux rencontrés chez les autres clostridia saccharolytiques tels que *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum* ou encore *Clostridium pasteurianum* (Desvaux *et al.*, 2001b, 2001c).

En modélisant le flux carboné lors de croissances en cultures continues sur cellulose en conditions d'ammonium limitant, cette étude permettra de connaître l'influence de ces conditions de cultures sur le catabolisme de la cellulose.

II. Résultats

Cette étude fut publiée dans la revue *Applied and Environmental Microbiology* dans un article intitulé : "Flux analysis of the metabolism of *Clostridium cellulolyticum* grown in cellulose-fed continuous culture on a chemically defined medium under ammonium-limited conditions." 2001, 67 : 3846-3851.

Flux Analysis of the Metabolism of *Clostridium cellulolyticum* Grown in Cellulose-Fed Continuous Culture on a Chemically Defined Medium under Ammonium-Limited Conditions

MICKAËL DESVAUX AND HENRI PETITDEMANGE*

Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +, Domaine Scientifique Victor Grignard, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex, France

Received 20 March 2001/Accepted 31 May 2001

An investigation of cellulose degradation by the nonruminant, cellulolytic, mesophilic bacterium *Clostridium cellulolyticum* was performed in cellulose-fed chemostat cultures with ammonium as the growth-limiting nutrient. At any dilution rate (D), acetate was always the main product of the catabolism, with a yield of product from substrate ranging between 37.7 and 51.5 g per mol of hexose equivalent fermented and an acetate/ethanol ratio always higher than 1. As D rose, the acetyl coenzyme A was rerouted in favor of ethanol pathways, and ethanol production could represent up to 17.7% of the carbon consumed. Lactate was significantly produced, but with increasing D , the specific lactate production rate declined, as did the specific rate of production of extracellular pyruvate. The proportion of the original carbon directed towards phosphoglucosyltransferase remained constant, and the carbon surplus was balanced mainly by exopolysaccharide and glycogen biosyntheses at high D values, while cellodextrin excretion occurred mainly at lower ones. With increasing D , the specific rate of carbon flowing down catabolites increased as well, but when expressed as a percentage of carbon it declined, while the percentage of carbon directed through biosynthesis pathways was enhanced. The maximum growth and energetic yields were lower than those obtained in cellulose-limited chemostats and were related to an uncoupling between catabolism and anabolism leading to an excess of energy. Compared to growth on cellobiose in ammonium-limited chemostats (E. Guedon, M. Desvaux, and H. Petitdemange, *J. Bacteriol.* 182:2010–2017, 2000), (i) a specific consumption rate of carbon of as high as 26.72 mmol of hexose equivalent g of cells⁻¹ h⁻¹ could not be reached and (ii) the proportions of carbon directed towards cellodextrin, glycogen, and exopolysaccharide pathways were not as high as first determined on cellobiose. While the use of cellobiose allows highlighting of metabolic limitation and regulation of *C. cellulolyticum* under ammonium-limited conditions, some of these events should then rather be interpreted as distortions of the metabolism. Growth of cellulolytic bacteria on easily available carbon and nitrogen sources represents conditions far different from those of the natural lignocellulosic compounds.

Clostridium cellulolyticum, a nonruminant, cellulolytic, mesophilic bacterium isolated from decayed grass (22), has enabled the catabolization of cellulosic materials. Lignocellulosic compounds usually contain high levels of carbon and low levels of nitrogen (10). Thus, in microbiota where cellulose degradation has occurred, a nitrogen-limited condition is most probably encountered by bacteria (1, 15, 16, 18, 22). A recent growth study of *C. cellulolyticum* under ammonium limitation indicated the importance of glucose-1-phosphate (G1P) and glucose-6-phosphate (G6P) metabolic nodes for the distribution of carbon flow inside and outside the bacterial cell (10). Yet, as was the case for most of the first investigations carried out with *C. cellulolyticum*, that study was performed with cellobiose, a soluble cellodextrin, which obviated the need for metabolic analysis on cellulose, where most difficulties in culture monitoring lay.

Recent investigations have shown that bypassing the cellulosome when *C. cellulolyticum* is grown on soluble glucide induces metabolic deregulation compared to growth on insol-

uble cellulose (4, 5, 7). Thus, some of the metabolic events previously observed on cellobiose would rather be interpreted as laboratory artifacts due to the use of a soluble substrate far different physically from cellulose (7); in the same way, the cultivation of *C. cellulolyticum* in a complex medium or under unregulated pH conditions appeared to be deleterious for optimum growth (6, 9, 11, 21) and aberrant compared to the natural bacterial ecosystem (14, 22).

The aim of the present work was thus to investigate, using the chemostat technique, how the fluxes of carbon metabolism were modified when *C. cellulolyticum* was grown in ammonium limitation with cellulose as the sole carbon and energy source.

MATERIALS AND METHODS

Organism and growth. *C. cellulolyticum* ATCC 35319 (22) was grown in a defined medium (11) containing various amount of cellulose MN301 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and ammonium as specified in Results. All experiments were performed in a segmented gas-liquid chemostat (5).

Analytical procedures. Biomass, cellulose concentration, ammonium, gas analysis, extracellular protein, amino acid, glucose, soluble cellodextrins, glycogen, acetate, ethanol, lactate, and extracellular pyruvate were determined as previously described (4–7, 10, 11). The intracellular compounds NAD⁺, NADH, ATP, ADP, and AMP and the enzymes pyruvate-ferredoxin (pyruvate-Fd) oxidoreductase (PFO) (EC 1.2.7.1), lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27), acetate kinase (EC 2.7.2.1), and alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) were extracted and assayed as described previously (4–7).

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +, Domaine Scientifique Victor Grignard, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex, France. Phone: 33 3 83 91 20 53. Fax: 33 3 83 91 25 50. E-mail: hpetitde@lcb.u-nancy.fr.

TABLE 1. Cellulose fermentation parameters from continuous steady-state cultures^a of *C. cellulolyticum* under ammonium-limited conditions

| Parameter (unit) | Results ^b obtained at a <i>D</i> value (h ⁻¹) of: | | | |
|--|--|---------------|---------------|-----------------|
| | 0.027 | 0.047 | 0.064 | 0.085 |
| Biomass (g liter ⁻¹) | 0.187 ± 0.021 | 0.167 ± 0.015 | 0.154 ± 0.017 | 0.062 ± 0.008 |
| Consumed cellulose (mM hexose eq) | 11.0 ± 0.6 | 7.5 ± 0.4 | 6.1 ± 0.3 | 2.1 ± 0.1 |
| Residual ammonium (mM) | 0.09 ± 0.01 | 0.80 ± 0.09 | 1.25 ± 0.13 | 3.02 ± 0.27 |
| Acetate (mM) | 12.29 ± 0.63 | 7.68 ± 0.38 | 5.51 ± 0.28 | 1.73 ± 0.09 |
| Ethanol (mM) | 2.19 ± 0.11 | 2.45 ± 0.13 | 2.60 ± 0.15 | 1.12 ± 0.07 |
| Lactate (mM) | 1.58 ± 0.09 | 0.54 ± 0.04 | 0.32 ± 0.02 | 0.05 ± 0.01 |
| Extracellular pyruvate (μM) | 257.1 ± 13.1 | 102.8 ± 5.5 | 54.2 ± 2.9 | ND ^c |
| H ₂ CO ₂ ratio | 1.65 | 1.57 | 1.46 | 1.24 |
| Glycogen (mg g of cells ⁻¹) | 147.9 ± 4.7 | 164.0 ± 5.3 | 151.2 ± 5.1 | 137.6 ± 4.4 |
| Cellobiose (mM) | 0.35 ± 0.13 | 0.17 ± 0.07 | 0.09 ± 0.04 | ND |
| Cellotriose (mM) | 0.11 ± 0.05 | 0.08 ± 0.02 | 0.05 ± 0.01 | ND |
| Extracellular proteins (mg liter ⁻¹) | 10.4 ± 0.7 | 4.6 ± 0.4 | 4.4 ± 0.3 | 0.9 ± 0.1 |
| Free amino acids (mg liter ⁻¹) | 102.6 ± 4.1 | 63.3 ± 2.5 | 50.0 ± 2.7 | 15.4 ± 0.8 |
| Carbon recovery (%) | 92.5 | 93.0 | 92.8 | 93.1 |

^a The cellulose input was around 1.87% (wt/vol) (i.e., 115.4 mM hexose eq) and ammonium was at 4.00 mM.

^b Values are the averages for samples at steady state ± standard deviations. Values without standard deviations were determined with an average accuracy of ±10%.

^c ND, not detectable.

Calculations and mapping of carbon flow. The distribution of the carbon flow within the central metabolic pathways of *C. cellulolyticum* when grown under cellulose-sufficient conditions was previously described (5–7).

The calculation of the specific rates $q_{\text{cellulose}}$, q_{acetate} , q_{ethanol} , $q_{\text{extracellular pyruvate}}$, q_{lactate} , q_{pyruvate} , $q_{\text{NADH produced}}$, $q_{\text{NADH used}}$, $q_{\text{NADH-Fd}}$, and q_{ATP} WAS described previously (7). $Y_{\text{Acc/S}}$, $Y_{\text{Eth/S}}$, and $Y_{\text{Lac/S}}$ are the yields of acetate, ethanol, and lactate from substrate, respectively, expressed in grams per mole of hexose equivalent (hexose eq) fermented. The molar yields of growth ($Y_{X/S}$) and energy (Y_{ATP}) and the maintenance coefficient (m) were determined as already reported (7). The global carbon balance, the energetic charge (EC), the oxidation/reduction index (O/R), the catabolic reduction charge (CRC), the energetic efficiency, the pool turnover, and the ratio of specific enzyme activity to metabolic flux (R) were calculated as indicated previously (5–7).

For stoichiometric modeling of *C. cellulolyticum* metabolism, the calculations of flux through each enzyme of the known metabolic pathway, expressed in milliequivalents of carbon (meqC) per gram of cells per hour, were done as previously described (5–7).

RESULTS

Cellulose degradation and biomass formation under ammonium-limited conditions. Preliminary results with cellulose-fed continuous cultures indicated that at above 8 g of cellulose liter⁻¹, biomass formation did not further increase even when the concentrations of ammonium or other nutrients were increased (data not shown), indicating that continuous cultures were then under carbon excess (31). With 4.0 mM ammonium, the nitrogen source was limited (10), since the residual ammonium concentration was 0.09 mM at the lowest *D* tested and reached 3.02 mM at a *D* value of 0.085 h⁻¹ (Table 1); such data are typical of continuous cultures performed under limitation of a selected nutrient (31). *C. cellulolyticum* was then cultured under cellulose-sufficient conditions (around 18.7 g of cellulose liter⁻¹) with ammonium as the growth-limiting nutrient (4.0 mM) (Table 1).

At the steady state of the chemostat, biomass was maximum at the lowest *D* tested, i.e., 0.187 g liter⁻¹, and declined further as *D* rose, to reach 0.062 g liter⁻¹ at a *D* value of 0.085 h⁻¹ (Table 1). Under these culture conditions, some undigested cellulose was always left by *C. cellulolyticum* (Table 1) and represented a high proportion of the original cellulose provided by the feed reservoir; the percentage of remaining cellulose ranged between 90.5 and 98.2%. In all of the runs,

microscopic examination of the culture revealed the presence of exopolysaccharides and that most bacteria adhered to the cellulose fibers and few bacteria were found free in the supernatant. Substantial amounts of cellodextrins, namely, cellobiose and cellotriose were detected in the supernatant (Table 1). Intracellular glycogen was produced at all *D* values and ranged from 137.6 to 164.0 mg g of cells⁻¹ (Table 1); cell growth under carbon excess and nitrogen limitation is usually the best condition for glycogen storage (24–26). The global carbon balance, taking into account acetate, ethanol, lactate, extracellular pyruvate, free amino acids, extracellular proteins, cellodextrins, and biomass, ranged between 92.5 and 93.1% (Table 1).

Impact of ammonium limitation on bacterial cellulose conversion. The percentage of carbon flowing toward fermentative metabolites, given by the ratio $q_{\text{pyruvate}}/q_{\text{cellulose}}$ (Table 2), indicated that 68.8 to 74.4% of the consumed cellulose was converted to extracellular pyruvate, lactate, CO₂, acetate, and ethanol. Acetate always remained the predominant fermentation end product, since it represented between 59.3 and 75.3% of the carbon flowing down the catabolite. As *D* rose, q_{acetate} and q_{ethanol} increased 1.3- and 4.8-fold, respectively, but the acetate/ethanol ratio then decreased from 5.61 to 1.54 (Table 2). The specific lactate production rate, however, decreased with *D*. The NADH balance ($q_{\text{NADH produced}}/q_{\text{NADH used}}$) was calculated from the catabolic pathways producing and consuming reducing equivalents. Both $q_{\text{NADH produced}}$ and $q_{\text{NADH used}}$ increased with *D* from 2.36 to 3.98 mmol g of cells⁻¹ h⁻¹ and from 0.86 to 3.14 mmol g of cells⁻¹ h⁻¹, respectively, whereas the $q_{\text{NADH produced}}/q_{\text{NADH used}}$ ratio declined from 2.74 to 1.27 (Table 2). NAD⁺ is reduced during the biosynthesis of acetate, lactate, and ethanol by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, but the regeneration of the NAD⁺ pool can occur only during lactate and ethanol production via dehydrogenase activities; NADH is then really oxidized by ethanol and lactate metabolic pathways, while acetate biosynthesis only generates reducing equivalents. Despite this apparent imbalance when only catabolic pathways were taken into account, the intracellular NADH/NAD⁺ ratio was always lower than 1 and the CRC remained constant at ca. 0.35 (Table 3). As previously

TABLE 2. Specific rates and yields of product formation in cellulose chemostats with ammonium as a limiting nutrient

| Parameter (unit) | Results ^a obtained at <i>D</i> value (h ⁻¹) of: | | | |
|--|--|-------|-------|-------|
| | 0.027 | 0.047 | 0.064 | 0.085 |
| Specific rates | | | | |
| <i>q</i> _{cellulose} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 1.58 | 2.10 | 2.52 | 2.90 |
| <i>q</i> _{pyruvate} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 2.36 | 3.03 | 3.53 | 3.98 |
| <i>q</i> _{acetate} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 1.77 | 2.16 | 2.29 | 2.38 |
| <i>q</i> _{ethanol} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 0.32 | 0.69 | 1.08 | 1.54 |
| <i>q</i> _{lactate} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 0.23 | 0.15 | 0.13 | 0.07 |
| <i>q</i> _{NADH produced} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 2.36 | 3.03 | 3.53 | 3.98 |
| <i>q</i> _{NADH used} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 0.86 | 1.53 | 2.29 | 3.14 |
| <i>q</i> _{NADH-Fd} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 1.50 | 1.49 | 1.23 | 0.84 |
| <i>q</i> _{ATP} (mmol g of cells ⁻¹ h ⁻¹) | 3.96 | 4.99 | 5.59 | 6.12 |
| Yields: | | | | |
| <i>Y</i> _{Acc/S} (g mol of hexose eq ⁻¹) | 51.5 | 47.4 | 41.8 | 37.7 |
| <i>Y</i> _{Eth/S} (g mol of hexose eq ⁻¹) | 9.2 | 15.1 | 19.7 | 24.4 |
| <i>Y</i> _{Lac/S} (g mol of hexose eq ⁻¹) | 6.6 | 3.4 | 2.4 | 1.0 |
| <i>Y</i> _{X/S} (g of cells mol of hexose eq ⁻¹) | 17.1 | 22.4 | 25.4 | 29.3 |
| <i>Y</i> _{ATP} (g of cells mol of ATP ⁻¹) | 6.8 | 9.4 | 11.4 | 13.9 |
| O/R | 1.02 | 0.97 | 0.95 | 0.99 |
| <i>q</i> _{NADH produced} / <i>q</i> _{NADH used} | 2.74 | 1.98 | 1.54 | 1.27 |
| ATP-Eff ^b | 2.50 | 2.37 | 2.22 | 2.11 |

^a Values calculated were determined with an average accuracy of ±10%.
^b ATP-Eff, energetic efficiency.

observed (7), an efficient reoxidation of NADH via H₂ production in addition to carbon fermentative pathways was underlined by O/R, H₂/CO₂, and *q*_{NADH produced}/*q*_{NADH used} variation.

In terms of the yield of product from substrate, both acetate and lactate decreased with increasing *D*, from 51.5 to 37.7 g mol of hexose eq⁻¹ and from 6.6 to 1.0 g mol of hexose eq⁻¹, respectively, while *Y*_{Eth/S} was enhanced from 9.2 to 24.4 g mol of hexose eq⁻¹ (Table 2). From the lowest to the highest *D* tested, the observed cell yields (*Y*_{X/S}) increased from 17.1 to 29.3 g of cells per mol of hexose eq consumed (Table 2); the *Y*_{X/S} is affected by both the microbial endogenous metabolism and maintenance energy requirements. From a Pirt plot of the data (*r*² = 0.995), a true growth yield (*Y*_{X/S}^{max}) of 41.8 g of biomass mol of hexose eq consumed⁻¹ and an *m* value of 0.9 mmol of hexose eq g of cells⁻¹ h⁻¹ were determined. The apparent energetic yield (*Y*_{ATP}) increased from 6.8 to 13.9 g of cells mol of ATP⁻¹ as *D* rose (Table 2). From a Pirt plot (*r*² = 0.992), a *Y*_{ATP}^{max} of 24.6 g of cells mol of ATP⁻¹ and an *m*_{ATP} of 2.9 mmol of ATP g of cells⁻¹ h⁻¹ were determined. A mean

value of 0.79 could be maintained for the adenylate EC for all of the dilution rates tested (Table 3).

Metabolic flux analysis of cellulose utilization in ammonium-limited chemostats. The modification of the carbon flow distribution in the central metabolic pathway of *C. cellulolyticum* when grown under ammonium-limited conditions with cellulose as the sole carbon and energy source is shown in Table 4. The rate of cellulose consumption varied from 9.50 to 17.39 meqC g of cells⁻¹ h⁻¹ from the lowest to the highest *D* tested (Table 4). With increasing *D*, *q*_{pyruvate} increased as well, but in terms of the percentage of the original carbon uptake, it represented from 74.4 to 68.8%, while carbon through biosynthesis pathways varied from 18.2 to 24.5% (Table 4). Regardless of *D*, most of the carbon directed toward biosynthesis was attributed to biomass of between 11.3 and 19.4%, while both extracellular proteins and free amino acids represented a proportion of the original carbon of between 5.2 and 6.9%.

Carbon flux was distributed differently over the known catabolic routes (acetate, ethanol, carbon dioxide, extracellular pyruvate, and lactate) as a function of *D*. One part of the flux

TABLE 3. Adenylate and pyridine nucleotide contents of *C. cellulolyticum* cells at steady state

| Parameter (unit) | Results ^a obtained at <i>D</i> value (h ⁻¹) of: | | | |
|---|--|-------------|--------------|-------------|
| | 0.027 | 0.047 | 0.064 | 0.085 |
| ATP (μmol g of cells ⁻¹) | 3.72 ± 0.19 | 4.16 ± 0.22 | 4.12 ± 0.20 | 3.24 ± 0.15 |
| ADP (μmol g of cells ⁻¹) | 1.54 ± 0.09 | 1.78 ± 0.08 | 2.42 ± 0.13 | 2.61 ± 0.14 |
| AMP (μmol g of cells ⁻¹) | 0.22 ± 0.02 | 0.45 ± 0.05 | 0.31 ± 0.04 | 0.23 ± 0.03 |
| EC | 0.82 | 0.79 | 0.78 | 0.75 |
| NADH (μmol g of cells ⁻¹) | 5.37 ± 1.06 | 4.23 ± 0.92 | 6.41 ± 1.33 | 5.77 ± 1.24 |
| NAD ⁺ (μmol g of cells ⁻¹) | 10.33 ± 2.09 | 8.52 ± 1.83 | 11.47 ± 2.34 | 9.78 ± 2.01 |
| NADH/NAD ⁺ ratio | 0.52 | 0.50 | 0.56 | 0.59 |
| CRC | 0.34 | 0.33 | 0.36 | 0.37 |

^a Values are the averages for samples at steady state ± standard deviations. Values without standard deviations calculated were determined with an average accuracy of ±10%.

TABLE 4. Carbon fluxes in cellulose-fed chemostats of *C. cellulolyticum* under ammonium-limited conditions

| Carbon flow ^a | Results obtained at a <i>D</i> value (h ⁻¹) of: | | | | | | | |
|--|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|
| | 0.027 | | 0.047 | | 0.064 | | 0.085 | |
| | meqC g of cells ⁻¹ h ⁻¹ | % | meqC g of cells ⁻¹ h ⁻¹ | % | meqC g of cells ⁻¹ h ⁻¹ | % | meqC g of cells ⁻¹ h ⁻¹ | % |
| <i>q</i> _{cellulose} | 9.50 | 100.0 | 12.61 | 100.0 | 15.11 | 100.0 | 17.39 | 100.0 |
| <i>q</i> _{G1P} | 5.98 | 68.0 | 7.94 | 63.0 | 9.51 | 63.0 | 10.95 | 63.0 |
| <i>q</i> _{celloextrin} | 0.89 | 9.3 | 1.04 | 8.0 | 0.81 | 5.4 | ND ^b | ND |
| <i>q</i> _{G1P towards celloextrin} | 0.49 | 5.2 | 0.58 | 4.6 | 0.46 | 3.1 | ND | ND |
| <i>q</i> _{β-glucan towards celloextrin} | 0.40 | 4.2 | 0.43 | 3.4 | 0.34 | 2.3 | ND | ND |
| <i>q</i> _{glycogen} | 0.15 | 1.6 | 0.29 | 2.3 | 0.36 | 2.4 | 0.43 | 2.5 |
| <i>q</i> _{exopolysaccharide} | 0.07 | 0.7 | 0.02 | 0.1 | 0.26 | 1.7 | 0.76 | 4.4 |
| <i>q</i> _{glucose} | 3.52 | 37.0 | 4.67 | 37.0 | 5.60 | 37.0 | 6.44 | 37.0 |
| <i>q</i> _{phosphoglucomutase} | 5.27 | 55.5 | 7.06 | 56.0 | 8.43 | 55.8 | 9.79 | 56.3 |
| <i>q</i> _{G6P} | 8.79 | 92.5 | 11.73 | 93.0 | 14.02 | 92.8 | 16.20 | 93.2 |
| <i>q</i> _{biosynthesis} | 1.73 | 18.2 | 2.63 | 20.9 | 3.45 | 22.8 | 4.26 | 24.5 |
| <i>q</i> _{pyruvate} | 7.07 | 74.4 | 9.10 | 72.2 | 10.58 | 70.0 | 11.94 | 68.6 |
| <i>q</i> _{acetyl-CoA} | 4.18 | 44.0 | 5.70 | 45.2 | 6.74 | 44.6 | 7.83 | 45.0 |
| <i>q</i> _{lactate} | 0.68 | 7.2 | 0.46 | 3.6 | 0.40 | 2.6 | 0.20 | 1.1 |
| <i>q</i> _{extracellular pyruvate} | 0.11 | 1.2 | 0.09 | 0.7 | 0.07 | 0.4 | ND | ND |
| <i>q</i> _{carbon dioxide} | 2.09 | 22.0 | 2.85 | 22.6 | 3.37 | 22.3 | 3.91 | 22.5 |
| <i>q</i> _{ethanol} | 0.63 | 6.7 | 1.38 | 10.9 | 2.16 | 14.3 | 3.08 | 17.7 |
| <i>q</i> _{acetate} | 3.55 | 37.3 | 4.32 | 34.3 | 4.58 | 30.3 | 4.75 | 27.3 |

^a Carbon flows were calculated as specified in Materials and Methods.
^b ND, not determined.

was converted to acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) via PFO. As *D* rose, *q*_{acetyl-CoA} increased, while the proportion of carbon flowing through PFO remained quite constant at around 44.7% (Table 4). *q*_{acetate} and *q*_{ethanol} increased with *D*, but, expressed as a percentage of *q*_{cellulose}, it appeared that the carbon fluxes split differently at this metabolic branch point; *q*_{acetate} production declined from 37.3 to 27.3% of the carbon uptake, while ethanol increased from 6.7 to 17.7% of the cellulose fermented (Table 4). Another part of the carbon flowing down glycolysis was oriented towards the lactate metabolic pathway, where lactate production dropped from 7.2 to 1.1%, as did the pyruvate leak, which decreased from 1.2 to be nil at the highest *D* tested (Table 4). The ratio of specific enzymatic activity to specific metabolic production rate (*R*) was always higher than 1 with the enzymes tested (Table 5). At each step in the central metabolic pathways, the intracellular concentrations of substrates, products, and cofactor and effector molecules, as well as intracellular ionic strength, redox potential, or pH, can influence the partitioning and regulation of the carbon flux (12). Nevertheless, the fact that fluxes were much less than the available enzyme activity indicated that the carbon flows

were determined by the concentration of substrate available more than by the enzyme activity (13).

The G6P pool was fueled by the carbon flowing from glucokinase and phosphoglucomutase activities and was further metabolized by glycolysis. The *q*_{G6P} increased from 8.79 to 16.23 meqC g of cells⁻¹ h⁻¹ with higher *D* and represented a mean of 92.3% of the carbon uptake (Table 4). The G1P came from celloextrin phosphorylase activity. From this metabolic node and under these culture conditions, G1P could either be stored as glycogen, be converted to exopolysaccharide or celloextrin, or flow down the glycolysis via phosphoglucomutase. The proportion of G1P directed towards celloextrin declined from 5.2% at a *D* of 0.027 h⁻¹ to nil at a *D* of 0.085 h⁻¹, since no celloextrin could then be detected (Tables 1 and 5). At low *D*, the percentages of carbon metabolized as exopolysaccharide and glycogen were low, and they increased to reach 4.4 and 2.5%, respectively, with the highest *D* tested (Table 4). The proportion of the carbon flux which was converted to celloextrins at low *D* was then rerouted towards glycogen and exopolysaccharide at higher *D* values. The carbon flow via phosphoglucomutase increased from 5.27 to 9.79 meqC g of

TABLE 5. Specific enzymatic activities in *C. cellulolyticum* cell extract at steady state in cellulose-fed chemostats with ammonium limitation

| Enzyme ^a | Results obtained at <i>D</i> value (h ⁻¹) of: | | | | | | | |
|---------------------|---|-----------------------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| | 0.027 | | 0.047 | | 0.064 | | 0.085 | |
| | Sp act ^b | <i>R</i> ^c | Sp act | <i>R</i> | Sp act | <i>R</i> | Sp act | <i>R</i> |
| LDH (EC 1.1.1.27) | 0.38 ± 0.08 | 74.4 | 0.25 ± 0.04 | 73.2 | 0.21 ± 0.05 | 68.4 | 0.12 ± 0.03 | 77.7 |
| PFO (EC 1.2.7.1) | 0.60 ± 0.05 | 12.8 | 0.76 ± 0.09 | 11.9 | 0.92 ± 0.14 | 12.1 | 1.02 ± 0.11 | 11.6 |
| AK (EC 2.7.2.1) | 0.78 ± 0.09 | 19.6 | 0.76 ± 0.08 | 15.6 | 0.69 ± 0.07 | 13.4 | 0.63 ± 0.05 | 11.8 |
| ADH (EC 1.1.1.1) | 0.18 ± 0.03 | 25.1 | 0.31 ± 0.05 | 19.9 | 0.38 ± 0.04 | 15.7 | 0.49 ± 0.06 | 14.2 |

^a LDH, lactate dehydrogenase; AK, acetate kinase; ADH, alcohol dehydrogenase.

^b Expressed in micromoles minute⁻¹ milligram of proteins⁻¹. Results are means and standard deviations

^c *R*, ratio of specific enzymatic activity to metabolic flux through the considered metabolic path; flux was expressed as micromoles milligram of protein⁻¹ minute⁻¹.

cells⁻¹ h⁻¹, but the proportion of the original carbon flowing through this metabolic pathway remained quite constant, ranging from 55.5 to 56.3% (Table 4).

DISCUSSION

In ammonium-limited chemostats with cellulose, the main product of cellulose catabolism was acetate. The proportion of the carbon flowing down PFO remained quite constant, but acetyl-CoA split differently as *D* rose. At low *D*, acetate production was favored, but acetyl-CoA was reoriented towards ethanol metabolic pathways as *D* rose, increasing the proportion of the carbon flux 2.6-fold towards ethanol from the highest to the lowest *D* tested. The specific lactate production rate as well as the pyruvate leak decreased with increasing *D*. A study of the interaction between carbon and nitrogen metabolisms in *Fibrobacter succinogenes* revealed modification of carbon fluxes (17), since addition of ammonium to resting cells metabolizing glucose induced acetate production.

When soluble β -glucans enter into the bacterial cell, they are first converted into G1P and G6P (4-7). Under ammonium-limited conditions, the proportion of the carbon flowing via phosphoglucosylase was quite constant at around 55.9%. The remaining G1P flowed in favor of cellodextrin biosynthesis at low *D* and towards exopolysaccharide and glycogen as *D* rose. On cellobiose, cellotriose production could represent up to 16.7% of the carbon uptake, while a maximum of 3.3% was obtained on cellulose. On cellobiose, as with cellulose, no cellodextrin longer than cellotriose was detected extracellularly (10). In addition, exopolysaccharide biosynthesis could account for 16.0% of the cellobiose fermented (10), against a maximum of 4.2% with cellulose as the carbon substrate. The stoichiometric model equation for exopolysaccharide formation gave consistent results when data from ammonium-limited chemostats with cellobiose (10) were applied to the equations developed in the present investigation. For example, at $D = 0.013$ h⁻¹ a $q_{\text{exopolysaccharide}}$ of 0.41 meqC g of cells⁻¹ h⁻¹ was obtained, against 0.54 meqC g of cells⁻¹ h⁻¹ using our equations, and at $D = 0.115$ h⁻¹ a $q_{\text{exopolysaccharide}}$ of 4.43 meqC g of cells⁻¹ h⁻¹ was obtained, against 4.65 meqC g of cells⁻¹ h⁻¹ using the equations developed in the present work.

In ammonium-limited chemostats with cellulose as the sole carbon and energy source, both $Y_{X/S}^{\text{max}}$, i.e., 41.8 g of biomass mol of hexose eq consumed⁻¹, and $Y_{\text{ATP}}^{\text{max}}$, i.e., 24.6 g of cells mol of ATP⁻¹, were lower than those under cellulose-limited conditions, where $Y_{X/S}^{\text{max}} = 50.5$ g of biomass mol of hexose eq consumed⁻¹ and $Y_{\text{ATP}}^{\text{max}} = 30.3$ g of cells mol of ATP⁻¹ (5), while m and m_{ATP} did not vary compared to those obtained with cellulose limitation (5). On the basis of the $Y_{\text{ATP}}^{\text{max}}$ (29, 30), the chemostat cultures with ammonium limitation used ATP inefficiently, and the calculated rate of spilling of ATP (q_{ATP}) was higher than that under cellulose-limited conditions (5). Such a decline of growth and energetic yields was related to the uncoupling between anabolism, which is limited by the nitrogen source, and catabolism, which is not limited by the carbon source, leading to an excess of energy. Such a phenomenon is generally encountered under such culture conditions and is not eliminated by the use of insoluble cellulose, where the entering carbon flow is nevertheless limited by the depolymerization rate of the cellulosome cellulases. Some continuous cultures

performed under limitation of nutrients other than the carbon source gave higher rates of carbon substrate utilization when the carbon was in excess than when the carbon was limited; these cultures had a greatly increased maintenance energy requirement and used the remaining energy more efficiently than in carbon-limited chemostats (19, 20, 28). Since maintenance energy, which corresponds to the expenditure of energy towards functions that are not directly growth related, did not increase, additional maintenance of growth potential which involved slip reactions was not taken into account when *C. cellulolyticum* was cultivated in ammonium limitation with cellulose as the sole carbon and energy source (20, 28) and the wasting of energy associated with maintenance function did not occur (3).

High intracellular concentrations of glycogen are often found when growth is limited, e.g., by phosphorus, sulfur, and nitrogen and in the presence of an excess of a carbon source (24-26). Here, the intracellular glycogen concentrations, i.e., between 137.6 and 164.0 mg g of cells⁻¹ and representing a proportion of the cellulose uptake by the cell of between 1.6 and 2.5%, were higher than those in cellulose-limited chemostats, which were between 58.8 and 108.7 mg g of cells⁻¹ and represented between 0.4 and 1.7% of the cellulose consumed (5). Compared to those of cellulolytic rumen bacteria, which can accumulate intracellular polysaccharide representing from around 30% and up to 60% of the cell dry weight (27), the glycogen storage capacity of *C. cellulolyticum*, even under the culture conditions used here, was more limited, since it did not exceed 16% of the cell dry weight. Under these culture conditions, glycogen was present at all dilution rates. Previous investigations with *C. cellulolyticum* suggested that the glycogen turnover was involved in carbon flow regulation (5, 10). Such observations could be compared with those on *F. succinogenes*, where glycogen turnover was observed with both cellobiose and cellulose (2, 8) and where study of the interaction of carbon and nitrogen metabolisms indicated that addition of ammonium to resting cells of *F. succinogenes* decreased the flux through glycogen biosynthesis (17).

In ammonium limitation with cellulose, the carbon flows down cellodextrin, exopolysaccharide, and glycogen were not as high as those with cellobiose. Such a metabolic event seems to be strongly related to the specific rate of consumption of the carbon substrate, which could reach 26.72 meqC g of cells⁻¹ h⁻¹ on cellobiose, against 17.39 meqC g of cells⁻¹ h⁻¹ on cellulose (Table 4). The use of a soluble carbon substrate allows highlighting of bacterial metabolic limitation by triggering deregulation of the metabolism (4-7, 10). On cellulose, a substrate more closely related to its natural ecosystem, *C. cellulolyticum* was enabled to deal with ammonium limitation. However, it should be pointed out that many of the anaerobic environments in which cellulose is degraded are deficient in combined nitrogen (14, 16, 23), and several previously described cellulolytic clostridia exhibited ammonium-repressible nitrogenase activity (15, 16, 18). Hence, in the same way that growth of *C. cellulolyticum* with soluble glucide appeared as an aberration when taking into account the natural bacterial ecosystem, cultures with ammonium as a sole and easily available nitrogen source could distort the bacterial metabolism, as suggested by a recent study with *Clostridium hungatei* (18). This could further explain the presence of free amino acids in the

culture supernatant even with ammonium limitation, which suggests that the uptake of nutrients and the generation of biosynthetic precursors occur faster than their utilization for biomass production. In the environment, natural lignocellulosic compounds contain hemicellulose and lignine in addition to cellulose fibers. The proportion and fitting together of these biopolymers and the nature of the nitrogen source certainly influence the degradative capacities of *C. cellulolyticum*, underlining that much remain to be learned about the N₂-fixing ability of and the catabolism of lignocellulose by cellulolytic bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Commission of European Communities FAIR program (contract CT950191 [DG12SSMA]) and by the Agrice program (contract 9701041).

We thank Sabine d'Andrea and Guy Raval for excellent technical assistance and Edward McRae for correcting the English and for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Bayer, E. A., and R. Lamed. 1992. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation* 3:171-188.
2. Bibollet, X., N. Bosc, M. Matulova, A. M. Delort, G. Gaudet, and E. Forano. 2000. ¹³C and ¹H NMR study of cellulose metabolism by *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Biotechnol.* 77:37-47.
3. Bond, D. R., and J. B. Russell. 1996. A role for fructose 1,6-diphosphate in the ATPase-mediated energy-spilling reaction of *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2095-2099.
4. Desvaux, M., E. Guedon, and H. Petitdemange. 2000. Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2461-2470.
5. Desvaux, M., E. Guedon, and H. Petitdemange. 2001. Carbon flux distribution and kinetics of cellulose fermentation in steady-state continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a chemically defined medium. *J. Bacteriol.* 183:119-130.
6. Desvaux, M., E. Guedon, and H. Petitdemange. 2001. Metabolic flux in cellulose batch and cellulose-fed continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* in response to acidic environment. *Microbiology* 147:1461-1471.
7. Desvaux, M., E. Guedon, and H. Petitdemange. 2001. Kinetics and metabolism of cellulose degradation at high substrate concentrations in steady-state continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3837-3845.
8. Gaudet, G., E. Forano, G. Dauphin, and A. M. Delort. 1992. Futile cycling of glycogen in *Fibrobacter succinogenes* as shown by in situ ¹H-NMR and ¹³C-NMR investigation. *Eur. J. Biochem.* 207:155-162.
9. Giallo, J., C. Gaudin, and J. P. Belaich. 1985. Metabolism and solubilization of cellulose by *Clostridium cellulolyticum* H10. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1216-1221.
10. Guedon, E., M. Desvaux, and H. Petitdemange. 2000. Kinetic analysis of *Clostridium cellulolyticum* carbohydrate metabolism: importance of glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate branch points for distribution of car-

- bon fluxes inside and outside cells as revealed by steady-state continuous culture. *J. Bacteriol.* 182:2010-2017.
11. Guedon, E., M. Desvaux, S. Payot, and H. Petitdemange. 1999. Growth inhibition of *Clostridium cellulolyticum* by an inefficiently regulated carbon flow. *Microbiology* 145:1831-1838.
12. Holms, H. 1986. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr. Top. Cell. Regul.* 28:69-105.
13. Holms, H. 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19:85-116.
14. Leschine, S. B., and E. Canale-Parola. 1983. Mesophilic cellulolytic clostridia from fresh water environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:728-737.
15. Leschine, S. B., and E. Canale-Parola. 1989. Carbon cycling by cellulose-fermenting nitrogen-fixing bacteria. *Adv. Space Res.* 9:149-152.
16. Leschine, S. B. K. Holwell, and E. Canale-Parola. 1988. Nitrogen fixation by anaerobic cellulolytic bacteria. *Science* 242:1157-1159.
17. Matheron, C., A. M. Delort, G. Gaudet, T. Liptaj, and E. Forano. 1999. Interaction between carbon and nitrogen metabolism in *Fibrobacter succinogenes* S85: a ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance and enzymatic study. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1941-1948.
18. Monserrate, E., S. B. Leschine, and E. Canale-Parola. 2001. *Clostridium hungatei* sp. nov., a mesophilic N₂-fixing cellulolytic bacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:123-132.
19. Neijssel, O. M., and D. W. Tempest. 1975. The regulation of carbohydrate metabolism in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 organisms growing in chemostat culture. *Arch. Microbiol. Physiol.* 106:251-258.
20. Neijssel, O. M., and D. W. Tempest. 1976. Bioenergetics aspects of aerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in carbon-limited and carbon-sufficient culture. *Arch. Microb. Physiol.* 107:215-221.
21. Payot, S., E. Guedon, C. Cailliez, E. Gelhaye, and H. Petitdemange. 1998. Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth. *Microbiology* 144:375-384.
22. Petitdemange, E., F. Caillet, J. Giallo, and C. Gaudin. 1984. *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic mesophilic species from decayed grass. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:155-159.
23. Postgate, J. R. 1982. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom
24. Preiss, J. 1984. Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 38:419-458.
25. Preiss, J., and T. Romeo. 1989. Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. *Adv. Microb. Physiol.* 30:183-233.
26. Preiss, J. 1996. Regulation of glycogen synthesis, p. 1015-1024. In F. C. Neidhardt, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed., vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
27. Russell, J. B. 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76:1955-1963.
28. Russell, J. B., and G. M. Cook. 1995. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* 59:48-62.
29. Stouthamer, A. H. 1973. A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. *Antonie Leeuwenhoek* 39:545-565.
30. Stouthamer, A. H., and C. Bettenhausen. 1973. Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta* 301:53-70.
31. Zeng, A. P. 1999. Continuous culture, p. 151-164. In A. L. Demain and J. E. Davies (ed.), *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. ASM Press, Washington, D.C.

III. Discussion

Les cultures en conditions d'ammonium limitant et de carbone saturant entraînent généralement un découplage énergétique entre les voies de l'anabolisme et du catabolisme (Larsson *et al.*, 1997) et la mise en place de réactions de dissipation d'énergie (Russell et Cook, 1995). En conditions d'ammonium limitant avec la cellulose comme seule source de carbone et d'énergie, les Y_{ATP}^{max} et $Y_{X/S}^{max}$ sont tous deux plus faibles que ceux obtenus en conditions de cellulose limitante (Desvaux *et al.*, 2001b). Ainsi les cultures en limitation d'ammonium sur cellulose n'utilisent pas l'ATP de manière optimale d'autant plus que le q_{ATP} est plus élevé qu'en condition de cellulose limitante. Une telle diminution des rendements énergétiques et de croissance est liée à un découplage entre l'anabolisme, qui est limité par la source d'azote, et le catabolisme, qui conduit à un excès d'énergie ; la production d'ATP est alors supérieure aux besoins énergétiques cellulaires. Ainsi la limitation par les cellulases du flux carboné entrant ne permet pas d'éviter ce phénomène. Les m et m_{ATP} quant à eux ne sont pas différents de ceux obtenus en conditions de cellulose limitante (Desvaux *et al.*, 2001b). Puisque la maintenance énergétique, qui correspond aux besoins énergétiques cellulaires vers des fonctions qui ne sont pas associées à la croissance (Neijssel et Tempest, 1976 ; Russell et Cook, 1995), n'augmente pas, un gaspillage énergétique associé aux fonctions de maintenance n'intervient pas (Bond et Russell, 1996).

Quand les cellodextrines solubles entrent dans la cellule bactérienne, elles sont d'abord converties en G1P et en G6P. Comme précédemment, la proportion de carbone traversant la phosphoglucomutase reste quasiment constante quelle que soit la vitesse spécifique du flux carboné entrant. En plus des voies de formation du glycogène, des exopolysaccharides ou du G6P, le G1P est aussi dirigé vers la formation de cellodextrines essentiellement aux faibles taux de dilution. Aucune cellodextrine dont la taille est supérieure au cellotriiose n'a cependant été détectée. En présence d'une source de carbone en excès et lorsque la croissance est limitée par un autre nutriment, de fortes concentrations en glycogène intracellulaire sont généralement observées (Preiss, 1996). En effet, la concentration de glycogène apparaît supérieure à celle obtenue en condition de cellulose limitante et atteint jusqu'à 16% du poids sec des cellules. Cependant ce résultat contraste avec les bactéries cellulolytiques du rumen pour lesquelles l'accumulation de polysaccharides intracellulaires peut représenter jusqu'à 60% du poids sec des cellules (Russell, 1998).

Dans des conditions de limitation en ammonium sur cellulose, le flux carboné dirigé vers le glycogène, les cellodextrines et les exopolysaccharides n'est pas aussi élevé que sur cellobiose ce qui serait encore associé à la vitesse spécifique de consommation du substrat carboné plus faible sur cellulose que sur cellobiose (Guedon *et al.*, 2000a). Aux faibles vitesses spécifiques de croissance, la production d'acétate est favorisée puis la proportion d'acétyl-CoA dirigée vers la voie de formation de l'éthanol augmente aux μ plus élevés. Quant à la production de lactate et de pyruvate extracellulaire,

elle diminue avec l'augmentation du taux de dilution. Sur cellulose, *Clostridium cellulolyticum* est donc capable de réguler efficacement son flux de carbone et d'électrons même en conditions d'ammonium limitant. Il faut cependant noter que les environnements naturels sont le plus souvent déficients en azote combiné (Postgate, 1983). Ainsi, de la même manière que la croissance de *Clostridium cellulolyticum* sur un substrat soluble est apparue comme une aberration métabolique, la croissance de cette bactérie en présence d'ammonium comme seule et unique source d'azote pourrait avoir entraîné certaines dérégulations métaboliques, d'autant que la plupart des bactéries cellulolytiques de l'environnement étudiées possèdent une activité nitrogénase réprimée en présence d'ammonium (Monserrate *et al.*, 2001).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Chapitre 3 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le nombre de travaux portant sur les cellulases et le cellulosome est considérable comparé à celui portant sur l'aspect métabolique de la digestion de la cellulose (Belaich *et al.* 1997 ; Mitchell, 1998 ; Schwarz, 2001a). L'objectif principal de ce travail était d'acquérir une meilleure connaissance de la physiologie de *Clostridium cellulolyticum* et des clostridia cellulolytiques mésophiles d'une manière générale. La mise en œuvre de cultures continues et discontinues avec *Clostridium cellulolyticum* a permis de dresser un schéma détaillé des régulations métaboliques développées par ce micro-organisme sur cellulose qui peut aussi servir de base pour la compréhension du rôle de ce micro-organisme dans l'environnement ou encore pour des applications biotechnologiques de cette bactérie.

L'étude du flux carboné lors de cultures discontinues et continues de *Clostridium cellulolyticum* sur un milieu synthétique contenant du cellobiose comme seule et unique source de carbone et d'énergie (Guedon *et al.*, 1999a), indiquait que les flux du carbone et des électrons étaient mieux contrôlés comparés aux cultures précédemment effectuées sur un milieu complexe riche en extrait de levure (Payot *et al.*, 1998). En effet, le rapport NADH/NAD⁺ restait compris entre 0,3 et 0,7 alors que des rapports aussi élevés que 57 étaient trouvés sur milieu complexe. Par ailleurs, la vitesse spécifique de consommation du cellobiose était bien plus élevée sur milieu synthétique puisqu'elle atteignait un maximum de 2,13 mmol.(g de biomasse)⁻¹.h⁻¹ pour seulement 0,68 mmol.(g de biomasse)⁻¹.h⁻¹ sur milieu complexe. Ces résultats ont permis d'écarter définitivement le défaut de contrôle du flux électronique comme la cause principale de l'inhibition de croissance chez *Clostridium cellulolyticum* en milieu synthétique. Lors d'une culture continue où la concentration en cellobiose était augmentée par paliers en maintenant les conditions de culture en carbone limitant, une biomasse supérieure à celle obtenue en conditions de carbone saturant a pu être obtenue. A l'inverse, une augmentation brutale de la concentration en cellobiose a entraîné une inhibition de croissance qui s'est manifestée par une chute de la biomasse et une augmentation de la concentration résiduelle en cellobiose. Ces données indiquent que sur cellobiose *Clostridium cellulolyticum* n'est pas capable d'optimiser sa croissance et

de réguler le flux carboné entrant. Cette interprétation a été confirmée par :

- des cultures discontinues où il a été démontré que l'inhibition de croissance n'était pas due à une carence nutritionnelle ou à une inhibition par des composés extracellulaires,
- la croissance de *Clostridium cellulolyticum* en tubes à dialyse où aucune inhibition de croissance n'est observée, le flux carboné étant limité par la vitesse de diffusion du substrat au travers de la membrane de dialyse.

Ces résultats ont été obtenus en utilisant une cellodextrine soluble, le cellobiose, censé représenter une croissance sur cellulose. Cependant, la cellulose étant un substrat insoluble, son utilisation par *Clostridium cellulolyticum* nécessite l'adhésion de la bactérie aux fibres de cellulose puis son hydrolyse en glucides solubles assimilables par la cellule bactérienne. Ainsi, la dégradation de la cellulose a été dans un premier temps étudiée lors de cultures discontinues (Desvaux *et al.*, 2000), en bioréacteur à pH régulé et en utilisant le milieu de culture chimiquement défini développé précédemment (Guedon *et al.*, 1999b). En fonction de la concentration en cellulose initiale, la distribution du flux carboné n'était pas identique ce qui indiquait une certaine flexibilité du métabolisme de *Clostridium cellulolyticum* :

- avec moins de 6,7 g.l⁻¹ de cellulose initiale, l'acétate, l'éthanol, le dihydrogène et le dioxyde de carbone étaient les produits majeurs de la fermentation. Dans cette gamme de concentrations, plus de 85% de la cellulose étaient dégradée en 5 jours. Par ailleurs, le flux électronique de la glycolyse était équilibré par la production de dihydrogène et d'éthanol, la concentration de ce dernier augmentant avec la concentration de cellulose initiale introduite.
- dans une gamme de concentration supérieure à 6,7 g.l⁻¹ de cellulose, le pourcentage de dégradation de la cellulose diminuait. La plupart de l'activité cellulasique restait associée aux fibres de cellulose. La densité cellulaire obtenue en fin de fermentation n'augmentait plus quelle que soit la concentration de cellulose ajoutée. Le flux carboné se réorientait vers la formation d'acétate aux dépens de la formation de l'éthanol tandis que la production de lactate augmentait. De façon assez surprenante, l'excrétion de pyruvate dans le milieu extracellulaire est observée, même sur cellulose. De manière concomitante, les rendements de croissance et énergétique chutaient ce qui semblait indiquer, comme sur cellobiose, que l'arrêt de croissance était associé à un flux carboné entrant élevé (Guedon *et al.*, 1999a).

L'ensemble des flux métaboliques obtenus sur cellulose était plus faible que sur cellobiose ce qui semble indiquer que le métabolisme mis en évidence sur cellobiose est faussé par rapport à un substrat plus proche des composés lignocellulosiques tels que la cellulose. Afin de surmonter l'arrêt de

croissance et d'améliorer la dégradation de la cellulose pour des concentrations en cellulose initiale supérieures à $6,7 \text{ g.l}^{-1}$, une culture discontinue a été réinoculée à 96 h d'intervalle. Cette procédure a permis d'augmenter la densité cellulaire, la digestion de la cellulose et la concentration des produits finaux comparativement à une culture discontinue classique. Ce résultat confirme que, même sur cellulose, l'arrêt de croissance n'est pas un phénomène d'inhibition extracellulaire, mais bien le résultat d'une auto-intoxication des cellules.

Certaines différences observées entre les premières investigations de Giallo *et al.* (1985) menées sur le métabolisme de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum* et l'étude précédente (Desvaux *et al.*, 2000) pouvaient être attribuées à la régulation du pH en cours de culture. Des croissances en cultures discontinues et continues de *Clostridium cellulolyticum* ont donc été effectuées afin d'évaluer l'influence de l'acidification du milieu de culture sur le catabolisme de la cellulose (Desvaux *et al.*, 2001a). En culture discontinue sans régulation du pH, une dégradation de la cellulose plus faible ainsi qu'une accumulation de glucides solubles issus de la cellulolyse plus importante ont été obtenus sur cellulose par rapport à une culture contrôlée à pH 7,2. Cette dégradation de la cellulose plus importante avec un pH régulé a permis une production plus importante de catabolites aux dépens d'une accumulation des cellodextrines solubles. Le contrôle du pH a amélioré la quantité de biomasse, d'éthanol et de lactate produits tandis que des concentrations en lactate et en pyruvate plus importantes ont été obtenues en conditions de pH non régulé. En cultures continues sur cellulose avec un taux de dilution constant et où le pH variait de 7,4 à 6,2, la densité cellulaire maximale a été obtenue à pH 7,0 ; à pH 6,4, elle était quatre fois plus faible. Ainsi, l'acidification du milieu de culture influence davantage la formation de la biomasse que la vitesse spécifique de consommation de la cellulose qui passe de 11,74 à 10,13 milliéquivalents carbonés.(g de biomasse)⁻¹.h⁻¹. Entre pH 7,4 et 6,4, il apparaissait que les rendements énergétiques et de croissance ne diminuaient pas, la transition vers l'arrêt de croissance se faisant de manière abrupte. La diminution du pH a induit le passage d'une fermentation acétate-éthanol à une fermentation lactate-éthanol. Dans le même temps, le rapport acétate/éthanol a diminué pour atteindre une valeur très proche de 1 à pH 6,4. Quel que soit le pH, la LDH était toujours en excès par rapport au flux métabolique dirigé vers la formation de lactate par contre la biosynthèse et l'efficacité catabolique de la PFO diminuait comme l'indiquait le rapport de son activité spécifique enzymatique sur la vitesse spécifique de formation de l'acétyl-CoA qui chutait de 9,8 à 1,8. Le changement d'une seule unité de pH a induit des changements métaboliques considérables conduisant à l'arrêt de croissance à pH 6,2. Ainsi, *Clostridium cellulolyticum* apparaît aussi sensible que les bactéries cellulolytiques du rumen à l'acidification du milieu de culture. Les bactéries cellulolytiques anaérobies jusqu'ici étudiées ne peuvent pas croître à des pH inférieurs à 6 ce qui suggère que ces micro-organismes ont évolué dans des environnements où la tolérance à de telles conditions n'est pas requise pour une compétition efficace avec les autres micro-organismes du biotope.

Le catabolisme carboné de *Clostridium cellulolyticum* a jusqu'à présent été caractérisé en cultures continues en utilisant le cellobiose comme seule source de carbone. Les cultures discontinues effectuées sur cellulose (Desvaux *et al.*, 2000) indiquent que le métabolisme de cette bactérie n'est pas en tous points identique à celui obtenu sur un glucide soluble issu de la cellulolyse tel que le cellobiose. Ainsi, les caractéristiques métaboliques de *Clostridium cellulolyticum* ont été décrites de manière cinétique pour la fermentation de la cellulose en utilisant les techniques d'analyse de la culture continue (Desvaux *et al.*, 2001b). Ces cultures en continu pouvaient être qualifiées de cultures en chémostat puisque certaines caractéristiques physiologiques propres à *Clostridium cellulolyticum* en conditions de carbone limitant (Guedon *et al.*, 1999b) ont été enregistrées telles que :

- des rapports ATP/ADP inférieurs à 1,
- une production de lactate limitée aux vitesses spécifiques de croissance faibles,
- des rapports NADH/NAD^+ et $q_{\text{NADH produit}}/q_{\text{NADH utilisé}}$ diminués aux taux de dilution plus élevés.

Quel que soit le taux de dilution, l'éthanol et l'acétate étaient les produits finaux majeurs du catabolisme. Contrairement aux chémostats en cellobiose limitant (Guedon *et al.*, 1999b), aucun basculement métabolique d'une fermentation acétate-éthanol à une fermentation lactate-éthanol n'était observé pour des taux de dilution croissants. Le rapport acétate/éthanol était toujours supérieur à 1 mais il diminuait avec des vitesses spécifiques de croissance plus élevées. Sur cellulose, le G1P et le G6P appartenaient à des embranchements métaboliques importants puisqu'il y a d'autant plus de G1P généré que la cellodextrine soluble incorporée par la cellule est longue. La proportion de carbone traversant la phosphoglucomutase restait constante tandis que l'excès de carbone était dissipé vers la biosynthèse d'exopolysaccharides ou de glycogène. Le pourcentage de carbone métabolisé *via* la PFO diminuait avec l'augmentation de la vitesse spécifique de croissance. L'acétyl-CoA était principalement dirigé vers la formation d'acétate qui représentait au moins 27,1% du flux carboné entrant. Cependant la proportion de carbone dirigé vers les voies anaboliques et l'éthanol augmentait avec le D et atteignait respectivement 27,3 et 16,8% du flux carboné entrant pour un D de $0,083\text{h}^{-1}$. Les productions de lactate et de pyruvate restaient faibles et représentaient au maximum 1,5 et 0,2% respectivement du flux carboné entrant. Le rendement de croissance ($Y_{X/S}^{\text{max}}$) obtenu sur cellulose était plus élevé que sur cellobiose. Par comparaison avec le cellobiose, l'hydrolyse de la cellulose par le cellulosome introduit une régulation du flux carboné entrant supplémentaire qui conduit à des vitesses spécifiques de croissance plus faibles ; le métabolisme du carbone apparaît alors mieux régulé que sur cellobiose. *Clostridium cellulolyticum* semble donc bien adapté et même restreint à une croissance sur des substrats de type cellulosiques.

Par la suite, l'hydrolyse et la fermentation de la cellulose ont été étudiées en cultures continues avec des concentrations croissantes en cellulose (Desvaux *et al.*, 2001c). Avec un taux de dilution fixé

à $0,048 \text{ h}^{-1}$, la formation de la biomasse augmentait proportionnellement à la concentration de cellulose apportée par le réservoir d'alimentation ; cependant au-delà de $7,6 \text{ g.l}^{-1}$ de cellulose la densité cellulaire plafonnait. Le pourcentage de dégradation de la cellulose chute de $32,8\%$ à $8,3\%$ pour des concentrations en cellulose dans le réservoir d'alimentation passant de $1,9$ à $27,0 \text{ g.l}^{-1}$ respectivement, tandis que les cellodextrines solubles s'accumulaient et représentaient jusqu'à $4,0\%$ du carbone consommé. Le basculement des cultures de condition cellulose limitante à cellulose saturante s'accompagnait d'une augmentation du rapport acétate/éthanol ainsi que d'une production plus importante de lactate. Une étude cinétique du métabolisme de *Clostridium cellulolyticum* en condition de substrats saturants a aussi été effectuée ; comparativement aux cultures en conditions de cellulose limitante (Desvaux *et al.*, 2001b), dans les cultures continues en conditions de cellulose saturant, nous avons pu observer que :

- les rapports ATP/ADP, NADH/NAD⁺ et $q_{\text{NADH produit}}/q_{\text{NADH utilisé}}$ étaient élevés et reliés à un catabolisme plus actif,
- le rapport acétate/éthanol augmentait alors que la production de lactate diminuait avec des taux de dilution croissants,
- les $Y_{\text{ATP}}^{\text{max}}$ et $Y_{\text{X/S}}^{\text{max}}$ étaient plus faibles.

Clostridium cellulolyticum est donc capable de réguler et d'optimiser le métabolisme du carbone en conditions de saturation de cellulose. Cependant, le fait qu'une partie des glucides catabolisés et donc de l'ATP, ne soient plus associés à la production de biomasse en condition d'excès de cellulose et que de manière concomitante apparaisse une production de lactate et une excrétion de pyruvate suggère une accumulation de composé(s) intracellulaire(s) inhibiteur(s) (Guedon *et al.*, 1999a). Ces derniers peuvent par ailleurs expliquer l'établissement d'un état stationnaire des cultures continues dans des conditions d'excès de tous les nutriments. Quelques différences ont pu être observées entre une croissance en conditions de cellobiose saturant (Guedon *et al.*, 2000b) et en conditions de cellulose saturant, en effet, tandis que :

- avec le cellobiose comme seule source de carbone, des flux carbonés entrants aussi élevés que $5,14 \text{ mmol.}(g \text{ de biomasse})^{-1}.\text{h}^{-1}$ pouvaient être atteints, le flux carboné entrant maximum obtenu sur cellulose n'excédait pas $2,91 \text{ mmol.}(g \text{ de biomasse})^{-1}.\text{h}^{-1}$,
- sur cellobiose les rapports NADH/NAD⁺ pouvaient atteindre $1,51$, ils étaient toujours inférieurs à 1 sur cellulose,
- sur cellobiose une proportion importante du flux carboné pouvait être dirigée vers les exopolysaccharides, les protéines extracellulaires ou encore les acides aminés libres, ces débordements métaboliques étaient bien plus limités sur cellulose.

Toutes ces différences sont associées au flux carboné entrant plus élevé sur cellobiose que sur cellulose.

Enfin, l'étude de la dégradation de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum* a été effectuée en cultures continues avec l'ammonium comme nutriment limitant de la croissance (Desvaux et Petitdemange, 2001). Quel que soit le taux de dilution, l'acétate était une fois encore le produit majeur du catabolisme de la cellulose. Lorsque le taux de dilution augmentait, l'acétyl-CoA était réorienté vers la formation d'éthanol, qui pouvait représenter jusqu'à 17,7% du carbone consommé, le rapport acétate/éthanol restait cependant toujours supérieur à 1. Le lactate était produit de manière significative, mais avec des taux de dilution croissants, la vitesse spécifique de production du lactate déclinait de la même manière que la vitesse spécifique de formation du pyruvate extracellulaire. La proportion du flux carboné entrant dirigée vers la phosphoglucomutase restait constante, le surplus de carbone était dissipé principalement par les voies de biosynthèse des exopolysaccharides et du glycogène aux taux de dilution élevés tandis que l'excrétion de cellobiose et de celotriose se produisait essentiellement aux taux de dilution faibles. Avec l'augmentation du taux de dilution, la vitesse spécifique du flux carboné dirigé vers les catabolites augmentait, mais à l'inverse du flux dirigé vers les voies anaboliques, elle représentait une proportion du flux carboné entrant de moins en moins importante. Les Y_{ATP}^{max} et $Y_{X/S}^{max}$ étaient plus faibles que ceux obtenus en conditions de cellulose limitante (Desvaux *et al.*, 2001b) indiquant un découplage entre l'anabolisme et le catabolisme conduisant à un excès d'énergie. Par comparaison avec une croissance en conditions d'ammonium limitant sur cellobiose (Guedon *et al.*, 2000a) :

- des vitesses spécifiques de consommation du substrat carboné aussi élevées que $26,72 \text{ mmol} \cdot (\text{g de biomasse})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ne pouvaient être atteintes sur cellulose.
- les proportions du carbone dirigé vers les cellodextrines, le glycogène et les exopolysaccharides n'étaient pas aussi élevées que celle déterminées sur cellobiose.

Tandis que l'utilisation du cellobiose a permis de mettre en exergue les limitations métaboliques et les régulations de *Clostridium cellulolyticum* en conditions de limitation en ammonium, en carbone et de saturation de substrats. Certaines de ces réponses métaboliques doivent être interprétées comme des distorsions du métabolisme. De même que la croissance de *Clostridium cellulolyticum* sur un substrat carboné soluble facilement disponible induit des dérégulations du métabolisme, l'ammonium peut aussi être considéré comme une source d'azote facilement assimilable surtout pour des bactéries anaérobies de l'environnement (Leschine, 1995).

L'étude du métabolisme de *Clostridium cellulolyticum* sur cellulose pourrait se résumer à une succession d'études utilisant des conditions de culture peu adaptées à la physiologie de ce micro-

organisme. En effet, cette bactérie cellulolytique de l'environnement :

- a dans un premier temps été cultivée sur un milieu complexe enrichi en extrait de levure alors que son écosystème naturel est vraisemblablement plutôt oligotrophe.
- a été longtemps étudiée sur cellobiose qui est une cellodextrine soluble dont la nature physique reste très éloignée des composés lignocellulosiques naturels.
- est particulièrement sensible à l'acidification du milieu de culture comme toutes les bactéries cellulolytiques anaérobies étudiées. L'influence du pH a pourtant été écartée dès les premières études métaboliques.
- a un flux carboné entrant suffisamment important même sur cellulose pour entraîner un arrêt de croissance. Une étude du métabolisme de *Clostridium cellulolyticum* sur un substrat de type lignocellulosique serait nécessaire afin de vérifier si cette excrétion de pyruvate est bien le résultat de l'utilisation d'une cellulose commerciale trop facilement hydrolysable ou s'il s'agit d'une régulation métabolique.
- pourrait utiliser principalement l'azote atmosphérique dans son environnement naturel comme beaucoup de clostridia cellulolytiques (Leschine, 1995). De la même manière que le cellobiose, la présence d'une source d'azote abondante et facilement assimilable tel que l'ammonium pourrait entraîner des dérégulations métaboliques, cette hypothèse nécessite elle aussi une investigation plus poussée (Monserrate *et al.*, 2001).

Tout ceci se rapproche des problèmes plus larges que posent les phénomènes de non cultivabilité de certaines bactéries de l'environnement. En effet, la procédure classique de régénération d'isolats bactériens implique la croissance des micro-organismes dans des milieux d'enrichissement afin de parer à toutes carences nutritionnelles. Cependant, à partir des résultats obtenus ici, il est envisageable que des bactéries plus sensibles encore que *Clostridium cellulolyticum* aient une croissance complètement inhibée par de telles conditions de culture.

Clostridium cellulolyticum apparaît donc adapté et même restreint à une croissance sur un substrat de type cellulosique. Cependant, bien que plus limité sur cellulose que sur cellobiose, un flux carboné entrant élevé entraîne un arrêt de croissance corrélé à une excrétion de pyruvate traduisant une accumulation intracellulaire d'intermédiaire(s) métabolique(s). Bien qu'il ne soit pas encore démontré que le pyruvate soit le véritable inhibiteur direct de la croissance, cet aspect du métabolisme de *Clostridium cellulolyticum* nécessitant une étude plus poussée, il peut être supposé que la croissance soit améliorée si ce composé ne s'accumule pas.

Par ailleurs, cette étude physiologique devrait être approfondie par une approche moléculaire notamment par une analyse transcriptionnelle des enzymes du catabolisme en relation avec celle des

gènes du cellulosome. De récentes études suggèrent en effet que l'activité catalytique du cellulosome pourrait être modulée en fonction du substrat insoluble à hydrolyser (Mouhand-Oussaid *et al.*, 1999 ; Schwarz, 2001a). Il faut aussi souligner que le métabolisme des autres glucides issus de la dégradation de la lignocellulose notamment celui des pentoses, tel que le xylose, ainsi que les transporteurs impliqués dans l'incorporation de ces glucides n'ont pas encore été caractérisés chez *C. cellulolyticum*.

L'étude physiologique détaillée de ce métabolisme permet à présent d'envisager l'amélioration par ingénierie métabolique du catabolisme de la cellulose chez *Clostridium cellulolyticum* (Otergaard *et al.*, 2000). En effet, des plasmides navettes entre *Escherichia coli* et les espèces du genre *Clostridium* sont disponibles ainsi que des protocoles d'électrotransformation et des techniques de cultures en boîtes de Pétri pour ce micro-organisme présentant une sensibilité importante à l'oxygène (Jennert *et al.*, 2000).

Une première approche consiste à détourner le flux carboné vers une voie de délestage afin de limiter l'accumulation intracellulaire de pyruvate (Guedon, 2000). Dans cette optique, une nouvelle voie métabolique en prise directe sur le pyruvate a été constituée à partir d'une pyruvate décarboxylase (PDC) (EC 4.1.1.1) et d'une alcool déshydrogénase (ADH). Un opéron artificiel sous contrôle d'un promoteur ferrédoxine constitutif de *Clostridium pasteurianum* (Graves *et al.*, 1985) a été construit à partir des gènes *pdv* et *adhII* de *Zymomonas mobilis* codants pour ces deux enzymes. L'expression hétérologue de ces gènes chez des entérobactéries ou plus récemment des cyanobactéries s'est avérée très efficace (Ingram *et al.*, 1987, 1999 ; Lindsay *et al.*, 1995 ; Ming-De et Coleman, 1999 ; Otha *et al.*, 1991a, 1991b). Les premiers résultats obtenus indiquent qu'en culture discontinue sur cellulose, la croissance a été très nettement améliorée puisqu'une densité cellulaire supérieure et une dégradation plus importante du substrat cellulosique a été obtenue par rapport à la souche sauvage. Cependant, de manière assez surprenante, l'éthanol n'est pas le produit majoritaire de la fermentation. Cette construction ne parvient pas à détourner tout le flux carboné vers la production d'éthanol. Au moins deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

- Dans toutes les conditions de culture étudiées aussi bien sur cellulose que sur cellobiose, l'acétate reste toujours le catabolite majeur produit lors de la croissance ce qui indique selon toute vraisemblance l'importance de cette voie catabolique dans le métabolisme de *Clostridium cellulolyticum*. Comme l'indique l'énergie de maintenance et les rendements énergétiques obtenus sur cellulose (Desvaux *et al.*, 2001a, 2001b), le détournement complet du flux métabolique en faveur de cette nouvelle voie de production de l'éthanol est sans doute physiologiquement impossible. Ainsi, il est possible que seuls les transformants pouvant produire de l'acétate et de l'éthanol selon les voies originales et ainsi maintenir une balance énergétique et d'oxydoréduction correcte aient pu être sélectionnés.

- Bien que les produits de ces deux gènes *pdh* et *adhII* soient exprimés chez *Clostridium cellulolyticum* l'activité spécifique de la PDC est plus faible que celle enregistrée chez d'autres espèces bactériennes où ce type de construction a été introduit. Les gènes issus de *Zymomonas mobilis*, dans *pdh* notamment, possèdent des codons rares pour *Clostridium cellulolyticum*. Si l'expression de ce gène n'est pas optimale, le flux carboné n'est donc pas correctement détourné vers la nouvelle voie de production de l'éthanol, la PDC étant l'enzyme en prise directe sur le pyruvate. L'expression hétérologue de ces gènes chez *Clostridium cellulolyticum* pourrait être améliorée notamment par mutagenèse dirigée.

Une autre approche possible consiste à favoriser l'écoulement du flux carboné principalement au niveau du pyruvate. Il peut ainsi être envisagé d'utiliser une PFO issue d'une autre espèce de *Clostridium* saccharolytique telle que *Clostridium pasteurianum* à partir duquel ce gène a été récemment isolé (Moulis *et al.*, 1996). La surexpression de cette enzyme grâce à un plasmide navette aurait plusieurs avantages par rapport à la stratégie précédente :

- Ce gène ne possède pas de codon rare pour *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium pasteurianum* étant phylogénétiquement plus proche que *Zymomonas mobilis*.
- Le flux carboné étant dirigé vers l'acétyl-CoA, il peut aussi bien être redirigé vers la formation d'acétate ou d'éthanol et ainsi répondre aux besoins énergétiques de la cellule.
- L'acétyl-CoA occupe une position stratégique dans l'orientation des flux cataboliques. Chez les clostridia, à partir de ce précurseur de nombreux catabolites primaires d'intérêt industriel se forment, notamment des solvants tels que l'éthanol, le butanol, l'acétone ou encore l'isopropanol. Si cette approche fonctionne, elle pourrait servir de base pour la production à partir de la cellulose d'autres catabolites que l'éthanol.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

- Adams M.W., E. Eccleston and J.B. Howard.** 1989. Iron-sulfur clusters of hydrogenase I and Hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* **86** : 4932-4936.
- Adams M.W. and L.E. Mortenson.** 1984. The physical and catalytic properties of hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. A comparison with hydrogenase I. *J. Biol. Chem.* **259** : 7045-7055.
- Adams M.W., L.E. Mortenson and J.S. Chen.** 1981. Hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* **594** : 105-176.
- Ahn J. and L.R. Lynd.** 1996. Cellulose degradation and ethano production by thermophilic bacteria using mineral growth medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57-58** : 599-604.
- Aksenova H., F.A. Rainey, P.H. Janssen, H.W. Morgan and G.A. Zavarzin.** 1992. *Spirochaeta thermophila* sp. nov. an obligately anaerobic polysaccharolytic member of the genus *Spirochaeta*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42** : 175-177.
- Alexander J. K.** 1972a. Cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum*. *Methods Enzymol.* **28** : 944-948.
- Alexander J. K.** 1972b. Cellodextrin phosphorylase from *Clostridium thermocellum*. *Methods Enzymol.* **28** : 948-953.
- Andersch W., H. Bahl and G. Gottschalk.** 1983. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18** : 327-332.
- Andersen K.B. and K. von Meyenburg.** 1977. Charges of nicotinamide adenine nucleotides and adenylate energy charge as regulatory parameters of the metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252** : 4151-4156.
- Angert E.R., K.D. Clements and N.R. Pace.** 1993. The largest bacterium. *Nature* **362** : 239-41
- Arai M., K. Tanaka and T. Kawaguchi.** 1994. Purification and properties of cellodextrin phosphorylase from *Clostridium thermocellum*. *J. ferment. Bioeng.* **77** : 239-242.
- Atalla R.H. and D.L. Vanderhart.** 1984. Native cellulose : a composite of two distinct crystalline forms. *Science* **223** : 283-285.
- Avitia C.I., F.X. Castellanos-Juarez, E. Sanchez, A. Tellez-Valencia, P. Fajardo-Cavazos, W.L. Nicholson and M. Pedraza-Reyes.** 2000. Temporal secretion of a multicellulolytic system in *Myxobacter* sp. AL-1 molecular cloning and heterologous expression of cel9 encoding a modular endocellulase clustered in an operon with cel48, an exocellobiohydrolase gene. *Eur J Biochem.* **267** : 7058-64

B

- Bagnara-Tardiff C., C. Gaudin, A. Bélaïch, P. Hoest, T. Citard and J. P. Bélaïch.** 1992. Sequence analysis of a gene cluster encoding cellulases from *Clostridium cellulolyticum*. *Gene* **119** : 17-28.
- Bains S., R.M. Corfield and R.D. Norris.** 1999. Mechanisms of climate warming at the end of the paleocene. *Science* **285** : 724-727.
- Bains S., R.D. Norris, R.M. Corfield and K.L. Faul.** 2000. Termination of global warmth at the palaeocene/eocene boundary through productivity feedback. *Nature* **407** : 143-144.

- Barnoud F.** 1980. La cellulose. Dans : *Les polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés*. (B. Montié ed.), p. 66-86. Gauthier-Villars, Paris.
- Barrow P.A., M.A. Lovell and Z. Barber.** 1996. Growth suppression in early stationary phase nutrient broth cultures of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* is genus specific and not regulated by σ^S . *J. Bacteriol.* **178** : 3072-3076.
- Bastawde K.B.** 1992. Xylan structure, microbial xylanases and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **8** : 353-368.
- Bauchop T.** 1981. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agric. Environ.* **6** : 339-348.
- Bayer E.A., H. Chanzy, R. Lamed and Y. Shoham.** 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Op. Struct. Biol.* **8** : 548-557.
- Bayer E.A., R. Kening and R. Lamed.** 1983. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J. Bacteriol.* **156** : 818-827.
- Bayer E.A. and R. Lamed.** 1986. Ultrastructure of the cell surface cellulosome of *Clostridium thermocellum* and its interaction with cellulose. *J. Bacteriol.* **167** : 828-836.
- Bayer E. A. and R. Lamed.** 1992. The cellulose paradox : pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource ? *Biodegradation.* **3** : 171-188.
- Bayer E.A., P.M. Coutinho and B. Henrissat.** 1999. Cellulosome-like sequences in *Archaeoglobus fulgidus* : an enigmatic vestige of cohesin and dockerin domains. *FEBS Lett.* **463** : 277-280.
- Bayer E.A., E. Morag and R. Lamed.** 1994. The cellulosome—a treasure-trove for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **12** : 379-386.
- Bayer E.A., Y. Shoham, J. Tormo and R. Lamed.** 1996. The cellulosome: a cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose. In : *Bacterial Adhesion Molecular and Ecological Diversity*. (M. Fletcher ed.), pp. 155-182. Wiley-Liss, New-York, NY.
- Béguin P. and J.P. Aubert.** 1992. La dégradation de la cellulose par les microorganismes. *Ann. Inst. Past.* **3** : 91-115.
- Béguin P. and J.P. Aubert.** 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* **13** : 25-58.
- Béguin P. and M. Lemaire.** 1996. The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* **31** : 201-236.
- Bélaich J.P., C. Tardif, A. Bélaich and C. Gaudin.** 1997. The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. *J. Biotechnol.* **57** : 3-14.
- Belanger A.E. and G.F. Hatfull.** 1999. Exponential-phase glycogen recycling is essential for growth of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **181** : 6670-6678.
- Béra-Maillet C., V. Broussolle, P. Pristas, J.P. Girardeau, G. Gaudet and E. Forano.** 2000a. Characterisation of endoglucanases EGB and EGC from *Fibrobacter succinogenes*. *Biochem. Biophys. Acta* **1476** : 191-202.
- Béra-Maillet C., G. Gaudet and E. Forano.** 2000b. Endoglucanase activity and relative expression of glycoside hydrolase genes of *Fibrobacter succinogenes* S85 grown on different substrates. *Biochem. Biophys. Acta* **1543** : 77-85.
- Berger E, W.A. Jones, D.T. Jones and D.R. Woods.** 1990. Sequencing and expression of a cellodextrinase (*ced1*) gene from *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c cloned in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **223** : 310-318.
- Bergquist P.L., M.D. Gibbs, D.D. Morris, V.S. Te'o, D.J. Saul and H.W.** 1999. Molecular diversity of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28** : 99-110.
- Bernalier A., G. Fonty, F. Bonnemoy and P. Gouet.** 1992. Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. *Curr. Microbiol.* **25** : 143-148.
- Bernalier A., G. Fonty, F. Bonnemoy and P. Gouet.** 1993. Inhibition of cellulolytic activity of *Neocallimastix frontalis* by *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Gen. Microbiol.* **139** : 873-880.
- Bhat S., P.W. Goodenought, E. Owen and M.K. Bhat.** 1993. Cellobiose : a true inducer of cellulosome in different strains of *Clostridium thermocellum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **111** : 73-78.
- Bibollet X., N. Bosc, M. Matulova, A.M. Delort, G. gaudet and E. Forano.** 2000. ^{13}C and ^1H NMR study of cellulose metabolism by *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Biotechnol.* **77** : 37-47.
- Bidle K.A., M. Kastner and D.H. Bartlett.** 1999. A phylogenetic analysis of microbial communities associated with methane hydrate containing marine fluids and sediments in the cascadia margin (ODP site 892B). *FEMS Microbiol. Lett.* **177** : 101-108.

- Bidlack J.E. and D.R. Buxton.** 1992. Content and deposition rates of cellulose, hemicellulose and lignin during regrowth of forages grass and legumes. *Can. J. Plant Sci.* **72** : 809-818.
- Bidlack J., M. Malone and R. Benson.** 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc. Okla. Acad. Sci.* **72** : 51-56.
- 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.
- Blackall L.L., A.C. Hayward and L.I. Sly.** 1985. Cellulolytic and extremophilic Gram-negative bacteria: revival of the genus *Cellvibrio*. *J. Appl. Bacteriol.* **59** : 81-97.
- Blair B.G and K.L. Anderson.** 1999. Cellulose-inducible ultrastructure protuberances and cellulose-affinity proteins of *Eubacterium cellulosolvens*. *Anaerobe* **5** : 547-554.
- Böck A and F.C. Neidhardt.** 1966. Properties of a mutant of *Escherichia coli* with temperature sensitive fructose-1,6-diphosphatase. *J. Bacteriol.* **92** : 470-476.
- Boetius A.J., K. Ravenschlag, C.J. Schubert, D. Rickert, F. Widdel, A. Gieseke, R. Amann, B.B. Jørgensen, U. White and O. Pfannkuche.** 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407** : 623-626.
- Bogdahn M. and D. Kleiner.** 1986. Inorganic nitrogen metabolism in two cellulose-degrading clostridia. *Arch. Microbiol.* **145** : 159-161.
- Boisset C., H. Chanzy, B. Henrissat, R. Lamed, Y. Shoham and E.A. Bayer.** 1999. Digestion of crystalline cellulose substrates by the *Clostridium thermocellum* cellulosome: structural and morphological aspects. *Biochem. J.* **340** : 829-835.
- Bolam D.N., A. Ciruela, S. McQueen-Mason, P. Simpsons, M.P. Williamson, J.E. Rixon, A. Boraston, G.P. Hazlewood and H.J. Gilbert.** 1998. *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem. J.* **331** : 775-781.
- Bond D.R. and J.B. Russell.** 1996. A role for fructose 1,6-diphosphate in the ATPase-mediated energy spilling reaction of *Sreptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 2461-2470.
- Bonhomme A.** 1988. Endo 1,4 β -glucanase and endo 1,4 β -xylanase of the ciliate *Epidinium ecaudatum* free of cellulolytic and hemicellulolytic bacteria. *Nippon Juigaku Zasshi* **50** : 543-547.
- Boos W. and J.M. Lucht.** 1996. Periplasmic binding protein dependent ABC transporters. Dans : *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology (F.C. Neidhardt ed.) p. 1175-1209. American Society for Microbiology, Whashington, DC.
- Booth I.R.** 1976. Cell membrane of *Clostridium pasteurianum*. PhD thesis, University of Wales.
- Booth I.R. and J.G. Morris.** 1975. Proton-motive force in the obligately anaerobic bacterium *Clostridium pasteurianum* : a role in galactose and gluconate uptake. *FEBS Lett.* **59** : 153-157.
- Bouyer J.** 1996. Méthodes statistiques : médecine-biologie. ESTEM, INSERM, Paris, France.
- Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principe of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254.
- Bredholt S., I.M. Mathrani and B.K. Ahring.** 1995. Extremely thermophilic cellulolytic anaerobes from Icelandic hot springs. *Antonie Leeuwenhoek* **68** : 263-271.
- Breznak J.A.** 1982. Intestinal microbiotaof termites and other xylophagous insects. *Annu. Rev. Microbiol.* **36** : 323-343.
- Bronnenmeier K., C. Ebenbichlerl and W.L. Staudenbauer.** 1990. Separation of the cellulolytic and xylanolytic enzymes of *Clostridium stercorarium*. *J. Chromatogr.* **521** : 301-310.
- Bronnenmeier K., K.P. Rücknagel and W.L. Staudenbauer.** 1991. Purification and properties of a novel type of exo-1,4- β -glucanase (Avicelase I) from the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*. *Eur. J. Biochem.* **200** : 379-385.
- Bronnenmeier K., K. Kundt, K. Riedel, W.H. Schwarzand W.L. Staudenbauer.** 1997. Structure of the *Clostridium stercorarium* gene *celY* encoding the exo-1,4- β -glucanase (Avicelase II). *Microbiology* **143** : 891-898.
- Brown R.M., I.M. Saxena and S.M. Kudlicka.** 1996. Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends Plant Sci.* **1** : 149-156.
- Bryant MP.** 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**:1324-1328.

C

- Caillez C., E. Benoit, J. P. Thirion and H. Pettdemange.** 1992. Characterization of ten mesophilic cellulolytic clostridia isolated from a municipal solid waste digester. *Curr. Microbiol.* **25** : 105-112.
- Canale-Parola E.** 1970. Biology of the sugar-fermentating *Sarcinae*. *Bacteriol. Rev.* **34** : 82-97.
- Carpita N. and D.M. Gibeaut.** 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3** : 1-30.
- Carrard G., A. Koivula, H. Söderlund and P. Béguin.** 2000. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97** : 10342-10347.
- Chen J.S.** 1993. Properties of acid- and solvent-forming enzymes of clostridia. Dans : *The Clostridia and Biotechnology* (D.R. Woods ed.), p. 51-74. Butterworth-heinemann, Stoneham, MA.
- Chen J.S. and P.J. Weimer.** 2001. Competition among three predominant ruminal cellulolytic bacteria in the absence or presence of non-cellulolytic bacteria. *Microbiology* **147** : 21-30.
- Cheng K.J., C.W. Fosberg, H. Minato and J.W. Costerton.** 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. Dans : *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. (T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawashima ed.), p. 595-624. Academic Press, Toronto, Ontario, Canada.
- Chung K.T.** 1976. Inhibitory effects of H₂ on growth of *Clostridium cellobioparum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **31** : 342-348.
- Coleman G.S.** 1978. The metabolism of cellulose, glucose and starch by the rumen ciliate protozoa *Eudiplodinium maggi*. *J. Gen. Microbiol.* **107** : 357-366.
- Coleman G.S.** 1992. The rate of uptake and metabolism of starch grains and cellulose particles by *Entodinium* species, *Eudiplodinium maggi* and some others endodiniomorphid protozoa and natural protozoal populations taken from the ovine rumen. *J. Appl. Bacteriol.* **73** : 507-513.
- Collins E.B.** 1972. Biosynthesis of flavor compound by microorganisms. *J. Dairy Sci.* **55** : 1022-1028.
- Collins M.D., P.A. Lawson, A. Willem, J.J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe and J.A.E. Farrow.** 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium* : proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44** : 812-826.
- Conrad R.** 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28** : 193-202.
- Cooper R.A.** 1984. Metabolism of methylglyoxal in microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **38** : 49-68.
- Costerton J.W, Z. Lwandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber and H.M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49** : 711-745.
- Coughlan M.P. and F. Mayer.** 1992. The cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. Dans : *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. 2nd ed. (A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer), p. 460-516. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Cousins S.K. and R.M. Brown.** 1995. CelluloseI microfibril assembly : computational molecular mechanics energy analysis favours bonding by van der Waals forces as the initial step in crystallisation. *Polymer* **36** : 3885-3888.
- Coutinho P.M. and B. Henrissat.** 1999. Carbohydrate-active enzymes server (CAZY). <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>
- Cox P.M., R.A. Betts, C.D. Jones, S.A. Spall and I.J. Totterdell.** 2000. Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature* **408** : 184-187
- Cozzarelli N.R., J.P. Koch and E.C. C. Lin.** 1965. Growth stasis by accumulated L- α -glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **90** : 1325-1329.
- Crowley T.J.** 2000. Causes of climate change over the past 1000 years. *Science* **289** : 270-277.

D

- Davies G. and B. Henrissat.** 1995. Structure and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3** : 853-859.
- Davies R. and M. Stephenson.** 1941. Studies on the acetone-butyl alcohol fermentation. I. Nutritional and other factors involved in the preparation of active suspensions of *Cl. acetobutylicum* (Weizmann). *Biochem. J.* **35** : 1320-1331.

- Davin L.B., H.B. Wang, A.L. Crowell, D.L. Bedgar, D.M. Martin, S. Sarkanen and N.G. Lewis.** 1997. Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary dirigent protein without an active center. *Science* **275** : 362-366.
- Dees C., D. Ringelberg, T.C. Scott and T. J. Phelps.** 1995. Taxonomic characterization of the cellulose degrading bacterium NCIMB 10462. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51/52** : 363-274.
- Decker K., M. Rössle and J. Kreusch.** 1976. The role nucleotides in the regulation of the energy metabolism of *Clostridium kluyveri*. Dans : *Microbial production and utilization of gases*. (H.G. Schlegel, G. Gottschalk and N. Pfennig ed.), p. 75-83. Akademie der Wissenschaften zu Göttingen, Göttingen, Germany.
- Delmer D.P.** 1999. Cellulose biosynthesis : exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50** : 245-276.
- Delworth T.L. and T.R. Knutson.** 2000. Simulation of early 20th century global warming. *Science* **287** : 2246-2250.
- Demain A.** 2000. Microbial biotechnology. *Trends Biotech.* **18** : 26-31.
- Desai R.P., L.M. Harris, N.E. Welker and E.T. Papoutsakis.** 1999a. Metabolic flux analysis elucidates the importance of acid-formation pathways in regulating solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Metab. Eng.* **1** : 206-213.
- Desai R.P., L.K. Nielsen and E.T. Papoutsakis.** 1999b. Metabolic flux analysis elucidates the importance of acid-formation pathways in regulating solvent production by *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *J. Biotechnol.* **71** : 191-205.
- Desvaux M., E. Guedon and H. Petitdemange.** 2000. Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 2461-2470.
- Desvaux M., E. Guedon and H. Petitdemange.** 2001a. Metabolic flux in cellulose batch and cellulose-fed continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* in response to acidic environment. *Microbiology* **147** : 1461-1471.
- Desvaux M., E. Guedon and H. Petitdemange.** 2001b. Carbon flux distribution and kinetics of cellulose fermentation in steady-state continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a chemically defined medium. *J. Bacteriol.* **183** : 119-130.
- Desvaux M., E. Guedon and H. Petitdemange.** 2001c. Kinetics and metabolism of cellulose degradation at high substrate concentrations in steady-state continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 3837-3845.
- Desvaux M. and H. Petitdemange.** 2001. Flux analysis of the metabolism of *Clostridium cellulolyticum* grown in cellulose-fed continuous culture on a chemically defined medium under ammonium-limited conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 3846-3851.
- Devillard E., C.J. Newbold, K.P. Scott, E. Forano, R.J. Wallace, J.P. Jouany and H.J. Flint.** 1999. A xylanase produced by the rumen anaerobic protozoan *Polyplastron multivesiculatum* shows close sequence similarity to family 11 xylanases from Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **1841** : 145-152.
- Ding S.Y., E.A. Bayer, D. Steiner, Y. Shoham and R. Lamed.** 1999. A novel cellulosomal scaffoldin from *Acetivibrio cellulolyticus* that contains a family 9 glycosyl hydrolase. *J. Bacteriol.* **181** : 6720-6729.
- Ding S.Y., E.A. Bayer, D. Steiner, Y. Shoham and R. Lamed.** 2000. A scaffolding of the *Bacteroides cellulosolvens* cellulosome that contains 11 type II cohesins. *J. Bacteriol.* **182** : 4915-4925.
- Dixon B.** 1996. Chaim Weizmann: from fermentation chemist to president of Israel. *Anaerobe* **2** : 195-196.
- Doi R.H., J.S. Park, C.C. Liu, L.M. Malburg, Y. Tamaru, A. Ichiishi and A. Ibrahim.** 1998. Cellulosome and noncellulosomal cellulases of *Clostridium cellulovorans*. *Extremophiles* **2** : 53-60.
- Dubois M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith.** 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* **168**: 167.
- Dubois M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28** : 350-356.
- Dunny G.M. and B.A.B. Leonard.** 1997. Cell-cell communication in Gram positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **51** : 527-564.
- Dürre P., A. Kuhn, M. Gottwald and G. Gottschalk.** 1987. Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26** : 268-272.
- Duong T.V.C., E.A. Johnson and A.L. Demain.** 1983. Thermophilic, anaerobic and cellulolytic bacteria. In : *Topics in enzyme and fermentation biotechnology*. (A. Weisman ed.), pp. 156-195. John Wiley & sons, New York, N.Y.

E

- Ellman G.L.** 1959. Tissue sulfhydryl groups *Arch. Biochem. Biophys.* **82** : 70-77.
- Elberson M.A., F. Malekzadeh, M.T. Yazdi, N. Kameranpour, M.R. Noori-Dloii., M.H. Matte, M. Hhahamat. R.R. Colwell and K.R. Sowers.** 2000. *Cellulomonas persica* sp. nov. and *Cellulomonas iranensis* sp. nov., mesophilic cellulose-degrading bacteria isolated from forest soil. *Int. J. System Evol. Microbiol.* **50** : 993-996.
- Eppard M., W.E. Krumbein, C. Koch, E. Rhiel, J.T. Staley and E. Stackebrandt.** 1996. Morphological, physiological and molecular characterization of *Actinomyces* isolated from dry soil, rocks and monument surfaces. *Arch. Microbiol.* **166** : 12-22.

F

- Fanutti C., T. Ponyi, G.W. Black, G.P. Halzwood and H.J. Gilbert.** 1995. The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulase and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *J. Biol. Chem.* **270** : 29314-29322.
- Fardeau M.L., B. Ollivier, J.L. Garcia and B.K. Patel.** 2001. Transfer of *Thermobacteroides leptospartum* and *Clostridium thermolacticum* as *Clostridium stercorarium* subsp. *leptospartum* subsp. *thermolacticum* subsp. nov. comb. nov. and *C. stercorarium* subsp. *thermolacticum* subsp. nov. comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51** : 1127-1131.
- Faure E., C. Bagnara, A. Bélaïch and J.P. Bélaïch.** 1988. Cloning and expression of two cellulase genes of *Clostridium cellulolyticum* in *Escherichia coli*. *Gene* **65** : 51-58.
- Felix C.R. and L.G.Ljungdahl.** 1993. The cellulosome : the exocellular organelle of *Clostridium*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47** : 791-819
- Ferdinand W.** 1964. The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochem. J.* **92** : 578-585.
- Ferscht A.** 1985. Enzyme structure and mechanism. W.H. Freeman and Co., New York, N.Y.
- Fields M.W., S. Mallik and J.B. Russell.** 2000. *Fibrobacter succinogenes* S85 ferment ball-milled cellulose as fast as cellobiose until cellulose surface area is limiting. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54** : 570-574.
- Fierobe H.P., C. Bagnara-Tardif, C. Gaudin, F. Guerlesquin, P. Sauve, A. Bélaïch and J.P. Bélaïch.** 1993. Purification and characterization of endoglucanase C from *Clostridium cellulolyticum* : catalytic comparison with endoglucanase A. *Eur. J. Biochem.* **217** : 557-565.
- Fierobe H.P., C. Gaudin, A. Bélaïch, M. Loutfi, E. Faure, C. Bagnara, D. Baty and J.P. Bélaïch.** 1991. Characterization of endoglucanase A from *Clostridium cellulolyticum*. *J. Bacteriol.* **173** : 7956-7962.
- Flint H.J.** 1997. The rumen microbial ecosystem-some recent developments. *Trends Microbiol.* **5** : 483-488.
- Fond O., E. Petitdemange, H. Petitdemange and J.M. Engasser.** 1983. Cellulose fermentation by a coculture of a mesophilic cellulolytic *Clostridium* and *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **13** : 217-224.
- Fraenkel D.G. and R.T. Vinopal.** 1973. Carbohydrate metabolism in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **27** : 69-100.
- Freier D., C.P. Mothershed and J. Wiegel.** 1988. Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:204-211.
- Fujino T., P. Béguin and J.P. Aubert.** 1992. Cloning of *Clostridium thermocellum* DNA fragment encoding polypeptides that bind the catalytic components of the cellulosome. *FEMS Microbiol. Lett.* **94** : 165-170.
- Fujino T., P. Béguin and J.P. Aubert.** 1993. Organization of *Clostridium thermocellum* gene cluster encoding the cellulosomal scaffolding protein CipA and a protein possibly involved in attachment of the cellulosome to the cell surface. *J. Bacteriol.* **175** : 1891-1899.

G

- Gal L., S. Pagès, C. Gaudin, A. Bélaïch, C. Reverbel-Leroy, C. Tardif and J.P. Bélaïch.** 1997. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) produced by *Clostridium cellulolyticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 903-909.
- Galinier A.** 2000. Rôle régulateur de la protéine Hpr chez les bactéries à Gram-positif. *Regard sur la Biochimie* **2** : 57-64.
- Garrigues C., P. Loubiere, N.D. Lindley and M. Coccain-Bousquet.** 1997. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *J. Bacteriol.* **179** : 5282-5287.
- Garrity G.M.** 2001. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Springer, New York, N.Y.
- Garvie E.I.** 1980. Bacterial lactate dehydrogenase. *Microbiol. Rev.* **44**: 106-139.

- Gaudet G., E. Forano, G. Dauphin and A.M. Delort.** 1992. Futile cycling of glycogen in *Fibrobacter succinogenes* as shown by in situ ¹H-NMR and ¹³C-NMR investigation. *Eur. J. Biochem.* **207** : 155-162.
- Gehin A., E. Gelhaye and H. Petitdemange.** 1996a. Adhesion of *Clostridium cellulolyticum* spores to filter paper. *J. Appl. Bacteriol.* **80** : 187-190.
- Gehin A., C. Cailleze, E. Petitdemange and L. Benoit.** 1996b. Studies of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 under dialysis and co-culture conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* **23** : 208-212.
- Gehin A., E. Gelhaye, G. Raval and H. Petitdemange.** 1995. *Clostridium cellulolyticum* viability and sporulation under cellobiose starvation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 868-871.
- Gelhaye E.** 1993. Etude de l'adhésion et de la colonisation de la cellulose par les clostridia cellulolytiques mésophiles. Thèse, Université de Nancy I, Nancy, France.
- Gelhaye E., L. Benoit, H. Petitdemange and R. Gay.** 1993a. Adhesive properties of five mesophilic, cellulolytic clostridia isolated from the same biotope. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102** : 67-73.
- Gelhaye E., B. Claude, C. Cailleze, S. Burle and H. Petitdemange.** 1992. Multilayer adhesion to filter paper of two mesophilic, cellulolytic clostridia. *Curr. Microbiol.* **25** : 307-311.
- Gelhaye E., A. Gehin and H. Petitdemange.** 1993b. Colonization of crystalline cellulose by *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 3154-3156.
- Gelhaye E., H. Petitdemange and R. Gay.** 1993c. Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose. *J. Bacteriol.* **175** : 3452-3458.
- Gerngross U T., M.P.M. Romaniec, T. Kobayashi, N. S. Huskisson and A.L. Demain.** 1993. Sequencing of a *Clostridium thermocellum* gene (*cipA*) encoding the cellulosomal S¹-protein reveals an unusual degree of internal homology. *Mol. Microbiol.* **8** : 325-334.
- Gerwig G.J., J.P. Kamerling, J.F. Vliegenthart, E. Morag, R. Lamed and E.A Bayer.** 1993. The nature of the carbohydrate-peptide linkage region in glycoproteins from cellulosomes of *Clostridium thermocellum* and *Bacteroides cellosolvans*. *J. Biol. Chem.* **268** : 26956-26960.
- Giallo J., C. Gaudin, J.P. Belaich, E. Petitdemange and F. Caillet-Mangin.** 1983. Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic *Clostridium* sp. strain H10. *Appl. Environ. Microbiol.* **45** : 843-849.
- Giallo J., C. Gaudin and J.P. Bélaich.** 1985. Metabolism and solubilization of cellulose by *Clostridium cellulolyticum* H10. *Appl. Environ. Microbiol.* **45** : 1216-1221.
- Giallo J.** 1984. Etude physiologique d'une bactérie cellulolytique mésophile anaérobie: *Clostridium cellulolyticum* (ATCC n° 35319). Thèse, Université d'Aix-Marseille 1, France.
- Girbal L., C. Croux, I. Vasconcelos and P. Soucaille.** 1995a. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol. Rev.* **17** : 287-297.
- Girbal L. and P. Soucaille.** 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. and P. Soucaille.** 1998. Regulation of solvent production *Clostridium acetobutylicum*. *Trends Biotechnol.* **16** : 11-16.
- Girbal L., I. Vasconcelos, S. Saint-Amans and P. Soucaille.** 1995b. How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiol. Rev.* **16** : 151-162.
- Godden B. and M.J. Penninckx.** 1984. Identification and evolution of the cellulolytic microflora present during composting of cattle manure: on the role of *Actinomycetes* sp. *Ann. Microbiol. (Paris)*. **135B** : 69-78.
- Goodwin S. and J.G. Zeikus.** 1987. Ecophysiological adaptations of anaerobic bacteria to low pH : analysis of anaerobic digestion in acidic bog sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 57-64.
- Gostomski P., M. Mühlemann, Y.H. Lin, R. Mormino and H. Bungay.** 1994. Auxostats for continuous culture research. *J. Biotechnol.* **37** : 167-177.
- Gottschal J.C.** 1992. Continuous culture. Dans : *Encyclopedia of microbiology*. Vol. 1 (J. Lederberg ed.), p. 559-572. Academic Press, New York, N.Y.
- Gottschal J.C. and J.G. Morris.** 1981. The induction of acetone and butanol production in cultures of *Clostridium acetobutylicum* by elevated concentrations of acetate and butyrate. *FEMS Microbiol. Lett.* **12** : 385-389.
- Gottschalk G.** 1986. Bacterial metabolism, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.

- Graves M.C., G.T. Mullenbach and J.C. Rabinowitz.** 1985. Cloning and nucleotide sequence determination of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxine gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 1653-1657.
- Graves, M. C. and J. C. Rabinowitz.** 1986. In vivo and in vitro transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. *J. Biol. Chem.* **261** : 11409-11415.
- Grupe H. and G. Gottschalk.** 1992. Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 3896-3902.
- Guedon E.** 2000. Analyse du métabolisme de *Clostridium cellulolyticum*. Importance des débordements cataboliques dans la distribution du flux du carbone et des électrons. Thèse, Université de Nancy I, Nancy, France.
- Guedon E., M. Desvaux and H. Petitdemange.** 2000a. Kinetic analysis of *Clostridium cellulolyticum* carbohydrate metabolism : importance of glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate branch points for distribution of carbon fluxes inside and outside cells as revealed by steady-state continuous culture. *J. Bacteriol.* **182** : 2010-2017.
- Guedon E., M. Desvaux, S. Payot and H. Petitdemange.** 1999a. Growth inhibition of *Clostridium cellulolyticum* by an inefficiently regulated carbon flow. *Microbiology* **145** : 1831-1838.
- Guedon E., S. Payot, M. Desvaux and H. Petitdemange.** 1999b. Carbon and electron flow in *Clostridium cellulolyticum* grown in chemostat culture on synthetic medium. *J. Bacteriol.* **181** : 3262-3269.
- Guedon E., S. Payot, M. Desvaux and H. Petitdemange.** 2000b. Relationships between cellobiose catabolism, enzyme levels and metabolic intermediates in *Clostridium cellulolyticum* grown in a synthetic medium. *Biotechnol. Bioeng.* **67** : 327-335.
- Guedon E., E. Petitdemange, C. Saint-Joly and M. Young.** 2000c. La dégradation de la cellulose. *Biofutur* **196** : 32-35.
- Guglielmi G. and P. Béguin.** 1998. Cellulase and hemicellulase genes of *Clostridium thermocellum* from five independent collections contain few overlaps and are widely scattered across the chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* **161** : 209-215.
- ## H
- Hägerdahl B., H. Harris and E.K. Pye.** 1979. Association of β -glucosidase with intact cells of *Thermoactinomyces*. *Biotechnol. Bioeng.* **21** : 345-55.
- Halstead J.R., P.E. Vercoe, H.J. Gilbert, K. Davidson and G.P. Hazlewood.** 1999. A family 26 mannase produced by *Clostridium thermocellum* as a component of the cellulosome contains a domain which is conserved in mannases from anaerobic fungi. *Microbiology* **145** : 3101-3108.
- Harrison D.E.F. and H.H. Topiwala.** 1974. Transient and oscillatory states of continuous culture. Dans : *Advanced biochemical engineering*, Vol. 3. (T.H. Ghose and A. Fiechter ed.), p. 168-219. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Hartmanis M.G.N., T. Klason and S. Gatenbeck.** 1984. Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20** : 66-71.
- Hayashi H., M. Takehara, T. Hattori, T. Kimura, S. Karita, K. Sakka and k. Ohmiya.** 1999. Nucleotide sequences of two contiguous and highly homologous xylanase genes *xynA* and *xynB* and characterization of XynA from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51** : 348-357.
- Hazlewood G.P. and H.J. Gilbert.** 1993. Xylan and cellulose utilization by the clostridia. Dans : *The clostridia and biotechnology*. (D.R. Woods ed.), p. 311-341. Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
- Heiner A.P., J. Sugiyama and O. Teleman.** 1995. Crystalline cellulose I $_{\alpha}$ and I $_{\beta}$ studied by molecular dynamics simulation. *Carbohydr. Res.* **273** : 207-223.
- Henrissat B. and G. Davies.** 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7** : 637-644.
- Henrissat B., T.T. Teeri and R.A.J. Warren.** 1998. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell wall of plants. *FEBS Lett.* **425** : 352-354.
- Hesselbo S.P., D.R. Grocke, H.C. Jenkyns, C.J. Bjerrum, P. Farrimond, H.S. Morgans Bell and O.R. Green.** 2000. Massive dissociation of gas hydrate during jurassic oceanic anoxic event. *Nature* **406** : 392-395.
- Herrero A.A.** 1983. End product inhibition in anaerobic fermentation. *Trends Biotechnol.* **1** : 49-53.
- Herrero, A. A. and R. F. Gomez.** 1980. Development of ethanol tolerance in *Clostridium thermocellum* : effect of growth temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **40** : 571-577.

- Herrero, A. A., R. F. Gomez and M. F. Roberts.** 1982. Ethanol induced changes in the membrane lipid composition of *C. thermocellum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **693** : 195-204.
- Herrero A.A., R.F. Gomez, B. Snedecor, C.J. Tolman and M.F. Roberts.** 1985. Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids : a mechanism based on uncoupling by weak acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22** : 53-62.
- Herzberg O. and R. Klevit.** 1994. Unraveling a bacterial hexose transport pathway. *Curr. Op. Struct. Biol.* **4** : 814-822.
- Hethener, P., A. Brauman and J.L. Garcia.** 1992. *Clostridium termitidis* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the gut of the wood-feeding termite, *Nasutitermes lujae*. *Syst. Appl. Microbiol.* **15** : 52-58.
- Hesselbo S.P., D.R. Grocke, H.C. Jenkyns, C.J. Bjerrum, P. Farrimond, H.S. Morgans Bell and O.R. Green.** 2000. Massive dissociation of gas hydrate during jurassic oceanic anoxic event. *Nature* **406** : 392-395.
- Higgins C.F.** 1992. ABC transporter: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8** : 67-113.
- Hinrichs K.U., J.M. Hayes, S.P. Sylva, P.G. Brewer and E.F. Delong.** 1999. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398** : 802-805.
- Hjortso M. A. and J. Nielsen.** 1994. A conceptual model of autonomous oscillations in microbial cultures. *Chem. Eng. Sci.* **49** : 1083-1095.
- Hobson P.N.** 1988. The rumen microbial ecosystem. Elsevier Science Publishers, New York, London.
- Hobson P.N. and C.S. Stewart.** 1997. The rumen microbial ecosystem. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, New York, N.Y.
- Hogsett D.A., H.J. Alm, T.D. Bernardez, C.R. South and L.R. Lynd.** 1992. Direct microbial conversion : prospects, progress and obstacles. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **34-35** : 527-541.
- Holms H.** 1986. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass and excretion of acetate. *Curr. Top. Cell. Regul.* **28** : 69-105.
- Holms H.** 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **19** : 85-116.
- Hommes F.A.** 1966. Effect of glucose on the level of glycolytic enzyme activities in different yeast species. *Arch. Microbiol.* **58** : 296-301.
- Hopgood M.F. and D.J. Walker.** 1967. Succinic acid production by rumen bacteria. I. Isolation and metabolism of *Ruminococcus flavefaciens*. *Aust. J. Biol. Sci.* **20** : 165-182.
- Hreggvidsson G.O., E. Kaiste, O. Holst, G. Eggertsson, A. Palsdottir and J.K. Kristjansson.** 1996. An extremely thermostable cellulase from the thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 3047-3049.
- Huang L. and C.W. Forsberg.** 1987. Isolation of a cellodextrinase from *Bacteroides succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 1034-1041.
- Huang L. and C.W. Forsberg.** 1990. Cellulose digestion and cellulase regulation and distribution in *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 1221-1228.
- Huang L., C.W. Forsberg and L.N. Gibbins.** 1986. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermentation products. *Appl. Environ. Microbiol.* **51** : 1230-1234.
- Huang L., L.N. Gibbins and C.W. Forsberg.** 1985. Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Clostridium acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **50** : 1043-1047.
- Huang K., F.B. Rudolph and G.N. Bennett.** 1999. Characterization of methylglyoxal synthase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its use in the formation of 1,2-propanediol. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 3244-3247.
- Hubert R., C.R. Woese, T.a. Langworthy, J.K. Kristjansson and K.O. Stetter.** 1990. *Fervidobacterium islandicum* sp. nov. a new extremely thermophilic eubacterium belonging to "Thermotogales". *Arch. Microbiol.* **154** : 105-111.
- Hungate R.E.** 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol.* **33** : 117-132.
- Hüsemann M.H.W. and E.T. Papoutsakis.** 1989. Comparison between in vivo and in vitro enzyme activities in continuous and batch fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30** : 585-595.

Iguchi M., S. Yamanaka and A. Budhiono. 2000. Bacterial cellulose: a masterpiece of nature's arts. *J. Mater. Sci.* **15** : 261-270.

Ingram L.O., T. Conway, D.P. Clark, G.W. Sewell and J.F. Preston. 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 2420-2425.

Ingram L.O., H.C. Aldrich, A.C. Borges, T.B. Causey, A. Martinez, F. Morales, A. Saleh, S.A. Underwood, L.P. Yomano, S.W. York, J. Zaldivar and S. Zhou. 1999. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol. Prog.* **15** : 855-866.

Irwin D.C., D.H. Shin, S. Zhang, B.K. Barr, J. Sakon, P.A. Karplus and D.B. Wilson. 1998. Roles of the catalytic domain and two cellulose-binding domains of *Thermomonospora fusca* E4 in cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* **180** : 1709-1714.

J

Jannash H.W. and T. Egli. 1993. Microbiol growth kinetics: a historical perspective. *Antonie Leeuwenhoek* **63** : 213-224.

Jennert K.C., C. Tardif, D.I. Young and M. Young. 2000. Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Microbiology* **146** : 3071-3080.

Jervis E.J., C.A. Haynes and D.G. Kilburn. 1997. Surface diffusion of cellulases and their isolation binding domains on cellulose. *J. Biol. Chem.* **272** : 24016-24023.

Jin F. and K. Toda. 1989. Purification and characterization of cellulases from *Clostridium thermocopriae* sp. nov. JT3-3. *J. Ferment. Bioeng.* **67** : 8-13

Johnson E.A. 1999. Anaerobic fermentations. Dans : *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2nd ed. (A.L. Demain and J.E. Davies, Ed.) p. 139-150. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Johnson E.A., A. Madia and A.L. Demain. 1981. Chemically defined minimal medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41** : 1060-1062.

Johnson J.L., J. Toth, S. Santiwatanakul and J.S. Chen. 1997. Cultures of *Clostridium acetobutylicum* from various collections comprise *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* and two other distinct types based on DNA-DNA reassociation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47** : 420-424.

Jones D.T. and D.R. Woods. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. rev.* **50** : 484-524.

Jones R.P. 1989. Biological principles of the effects of ethanol. *Enz. Microbiol. Technol.* **11** : 130-153.

Jones W.J., J.D.P. Nagle and W.B. Whitman. 1987. Methanogenesis and the diversity of archaeobacteria. *Microbiol. Rev.* **51** : 135-177.

Joos F., G.K. Plattner, T.F. Stocker, O. Marchal and A. Schmittner. 1999. Global warming and marine carbon cycle feedbacks on future atmospheric CO₂. *Science* **284** : 464-467.

Jungermann K., E. Rupprecht, C. Ohrloff, R. Thauer and K. Decker. 1971. Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-ferredoxin reductase system in *Clostridium kluyveri*. *J. Biol. Chem.* **246** : 960-963.

Jungermann K., R.K. Thauer, G. Leimenstoll and K. Decker. 1973. Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic clostridia. *Biochim. Biophys. Acta.* **305** : 268-280.

Jungermann K., R.K. Thauer, E. Rupprecht, C. Ohrloff and K. Decker. 1969. Ferredoxin mediated hydrogen formation from NADPH in a cell-free system of *Clostridium kluyveri*. *FEBS Lett.* **3** : 144-146.

K

Kakiuchi M., A. Isui, K. Suzuki, T. Fujino, T. Kimura, S. Karita, K. Sakka and K. Ohmiya. 1998. Cloning and DNA sequencing of the genes encoding *Clostridium josui* scaffolding protein CipA and cellulase CelD and identification of their gene products as major components of the cellulosome. *J. Bacteriol.* **180** : 4303-4308.

Kalachniuk H.I., M. Marounek, L.H. Kalachniuk and O.H. Savka. 1994. Rumen bacterial metabolism as affected by extracellular redox potential. *Ukr. Biokhim. Zh.* **66** : 30-40.

Kataeva I., X.L. Li, H. Chen, S.K. Choi and L.G. Ljungdahl. 1999. Cloning and sequence analysis of a new cellulase gene encoding CelK, a major cellulosome component of *Clostridium thermocellum*: evidence for gene duplication and recombination. *J. Bacteriol.* **181** : 5288-5295.

Katz M.E., D.K. Pak, G.R. Dickens and K.G. Miller. 1999. The source and fate of massive carbon input during the latest paleocene thermal maximum. *Science* **286** : 1531-1533.

- Keis S., C.F. Bennett, V.K. Ward and D.T. Jones.** 1995. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing clostridia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45** : 693-705.
- Kelly W.J., R.V. Asmundson and D.H. Hopcroft.** 1987. Isolation and characterization of a strictly anaerobic, cellulolytic spore former: *Clostridium chartatabidum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **147** : 169-173
- Kennett J.P., K.G. Cannariato, I.L. Hendy and R.J. Behl.** 2000. Carbon isotopic evidence for methane hydrate instability during quaternary interstadials. *Science* **288** : 128-133.
- Kerscher L. and D. Oesterhelt.** 1982. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. New findings on an ancient enzyme. *Trends Biochem. Sci.* **7** : 371-374.
- Kim C.H.** 1995. Characterization and substrate specificity of an endo- β -1,4-D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 959-965.
- Kistner A. and J.H. Kornelius.** 1990. A small-scale, three-vessel, continuous culture system for quantitative studies of planar fibre degradation by anaerobic bacteria. *J. Microb. Methods* **12** : 173-182.
- Kirby J., J. Martin, A. Daniel and H. Flint.** 1997. Dockerin-like sequence in cellulases and xylanases from the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **149** : 213-219.
- Kleijntjens R.H., P.A. De Boks and K.C.A.M. Luyben.** 1986. A continuous thermophilic cellulose fermentation in an upflow reactor by a *Clostridium thermocellum* containing mixed culture. *Biotechnol. Lett.* **8** : 667-672.
- Klingenberg M.** 1965. Nicotinamide-adenine dinucleotides (NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH). Spectrophotometric and fluorimetric methods. In : *Methods in enzymatic analysis*. (H.Y. Bergmeyer, ed.), pp. 2045-2059. Academic Press, New-York.
- Koch A.L.** 1997. Microbial physiology and ecology of slow growth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61** : 305-318.
- Kovárová-Kovar K. and T. Egli.** 1998. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol. Molecul. Biol. Rev.* **62** : 646-666.
- Kruus K., K.W. Wang, J. Ching and J.H.D. Wu.** 1995. Exoglucanase activities of the recombinant *Clostridium thermocellum* CelS, a major cellulosome component. *J. Bacteriol.* **177** : 1641-1644.
- Kudo H., K.J. Cheng and J.W. Costerton.** 1987. Electron microscopy study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. *Can. J. Microbiol.* **33** : 267-272.
- Kuga S. and R.M. Brown.** 1991. Physical structure of cellulose microfibrils: implications for biogenesis. Dans : *Biosynthesis and biodegradation of cellulose*. (C.H. Haigler and P.J. Weimer eds), p. 125-142. Marcel Dekker, New-York, NY.
- Kunding W., F.D. Kunding, B. Anderson and S. Roseman.** 1966. Restoration of active transport of glucosides in *Escherichia coli* by a component of a phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* **241** : 3243-3246.
- Kuznetsov S.I., G.A. Dubinina and N.A. Lapteva.** 1979. Biology of oligotrophic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **33** : 377-387.
- Kvenvolden K.A.** 1999. Potential effects of gas hydrate on human welfare. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** : 3420-3426.

L

- Lamed R. and E.A. Bayer.** 1988a. The cellulosome concept : Exocellular/extracellular enzyme reactor centers for efficient binding and cellulolysis. In : *Biochemistry and genetics of cellulose degradation* (J. P. Aubert, P. Béguin, J. Millet, Eds.), pp. 101-116. *Fems Symp.* **43**, Academic Press.
- Lamed R. and E.A. Bayer.** 1988b. The cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Adv. Appl. Microbiol.* **33** : 1-46.
- 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.
- Lamed R.J., J.H. Lobos and T.M. Su.** 1988. Effect of stirring and hydrogen on fermentation products of *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 1216-1221.
- Lamed E., J. Naimark, E. Morgenstern and E.A. Bayer.** 1987. Specialized cell surface structures in cellulolytic clostridia. *J. Bacteriol.* **169** : 3792-3800.
- Lamed R., E. Morag, O. Mor-Yosef and E.A. Bayer.** 1991. Cellulosome-like entities in *Bacteroides cellulosolvens*. *Curr. Microbiol.* **22** : 27-33.

- Lamed R., E. Setter, R. Kenig and E.A. Bayer.** 1983. The cellulosome-A discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **13** : 163-181.
- Landwall P. and T. Holme.** 1977. Removal of inhibitors of bacterial growth by dialysis culture. *J. Gen. Microbiol.* **103** : 345-352.
- Lapage S.P., J.E. Shelton, T.G. Mitchell and A.R. Mackenzie.** 1970. Culture collections and the preservation of bacteria. *Methods Microbiol.* **3A**:136-228.
- Larsson C., A. Nilsson, A. Blomberg and L. Gustafsson.** 1997. Glycolytic flux is conditionally correlated with ATP concentration in *Saccharomyces cerevisiae* : a chemostat study under carbon- or nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* **179** : 7243-50
- Leatherwood J.M.** 1965. Cellulase from *Ruminococcus albus* and mixed rumen microorganisms. *Appl. Microbiol.* **13** : 771-775.
- Lebloas P., N. Guilbert, P. Loubiere and N.D. Lindley.** 1993. Growth inhibition and pyruvate overflow during glucose catabolism by *Eubacterium limosum* is related to a limited capacity to reassimilate CO₂ by the acetyl-CoA pathway. *J. Gen. Microbiol.* **139** : 1861-1868.
- Lednicka D., J. Mergaert, M.C. Cnockaert and J. Swings.** 2000. Isolation and identification of cellulolytic bacteria involved in the degradation of natural cellulosic fibres. *Syst Appl Microbiol.* **23** : 292-299.
- Lee J.H. and R.M. Brown.** 1997. A comparative structural characterization of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei* : a high resolution electron microscopy study. *J. Biotechnol.* **57** : 127-136.
- Lee S.F., C.W. Forsberg and L.N. Gibbins.** 1985. Xylanolytic activities of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50** : 1068-1076.
- Lee S.S., J.K. Ha and K.J. Cheng.** 2000. Relative contributions of bacteria, protozoa and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 3807-3813.
- Leibovitz E. and P. Béguin.** 1996. A new type of cohesin domain that specifically binds the dockerin domain of the *Clostridium thermocellum* cellulosome-integrating protein CipA. *J. Bacteriol.* **178** : 3077-3084.
- Leibovitz E., H. Ohayon, P. Gounon and P. Béguin.** 1997. Characterization and subcellular localization of the *Clostridium thermocellum* scaffolding dockerin binding protein SdbA. *J. Bacteriol.* **179** : 2519-2523.
- Le Ruyet P., H.C. Dubourguier, G. Albagnac and G. Prensier.** 1985. Characterisation of *Clostridium thermolacticum* sp. nov. a hydrolytic thermophilic anaerobe producing high amounts of lactate. *Syst. Appl. Microbiol.* **6** : 196-202.
- Leschine S.B.** 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.* **49** : 399-426.
- Leschine S.B. and E. Canale-Parola.** 1983. Mesophilic cellulolytic clostridia from freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **46** : 728-737.
- Leschine S.B. and E. Canale-Parola.** 1989. Carbon cycling by cellulose fermentating nitrogen-fixing bacteria. *Adv. Space Res.* **9** : 149-152.
- Leschine S.B., K. Holwell and E. Canale-Parola.** 1988. Nitrogen fixation by anaerobic cellulolytic bacteria. *Science.* **242** : 1157-1159.
- Li X., H. Chen and L. Ljungdahl.** 1997. Two cellulases, CelA and CelC, from the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2 contain N-terminal docking domains for a cellulase-hemicellulase complex. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 4721-4728.
- Liebl W., P. Ruile, K. Bronnenmeier, K. Riedel, F. Lottspeich and I. Grief.** 1996. Analysis of a *Thermotoga maritima* DNA fragment encoding two similar thermostable cellulases CelA and CelB and characterization of the recombinant enzymes. *Microbiology* **142** : 2533-2542.
- Lin C., J.W Urbance and D.A. Stahl.** 1994. *Acetivibrio cellulolyticus* and *Bacteroides cellulosolvens* are members of the greater clostridial assemblage. *FEMS Microbiol. Lett.* **124** : 151-155.
- Lindsay S.E., R.J. Bothast and L.O. Ingram.** 1995. Improved strains of recombinant *Escherichia coli* for ethanol production from sugar mixtures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43** : 70-75.
- Ljungdahl L.G. and K.E. Eriksson.** 1985. Ecology of microbial cellulose dégradation. *Adv. Microb. Ecol.* **8** : 237-299.
- Llesuy S. and E.A. Lissi.** 1996. The steady-state hypothesis in complex biological systems. *Biochem. Edu.* **24** : 102-105.
- Loach P.A.** 1970. Oxidation-reduction potentials, absorbance bands and molar absorbance of compounds used in biochemical studies. Dans : *Handbook of biochemistry. Selected for molecular biology.* (H.A. Sober ed.) 2nd p. J33-J40. The Chemical Rubber Co.

London J. and M. Knight. 1966. Concentrations of nicotinamide nucleotide coenzymes in micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* **44** : 241-254.

Lou J., K.A. Dawson and H.J. Strobel. 1997. Role of phosphorolytic cleavage in cellobiose metabolism by the ruminal bacterium *Prevotella ruminicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 1770-1773.

Lowry O.H. and J.V. Passonneau. 1969. Phosphoglucomutase kinetics with the phosphates of fructose, glucose, mannose, ribose and galactose. *J. Biol. Chem.* **244** : 910-916.

Lynd L.R. 1996. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass : technology, economics, the environment and policy. *Annu. Rev. Energy. Environ.* **21** : 403-465.

Lynd L.R., J.H. Cushman, R.J. Nichols and C.E. Wyman. 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science* **251** : 1318-1323.

Lynd L.R., H.E. Grethlein and R.H. Wolkin. 1989a. Fermentation of cellulosic substrates in batch and continuous culture by *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 3131-3139.

Lynd L.R., C.E. Wyman and T.U. Gerngross. 1989b. Biocommodity engineering. *Biotechnol. Prog.* **15** : 777-793.

M

McBee R.H. 1950. The anaerobic thermophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **14** : 51-63.

McKenzie C.R., D. Bilous and K.G. Johnson. 1984. Purification and characterization of an exoglucanase from *Streptomyces flavogriseus*. *Can. J. Microbiol.* **30** : 1171-1178.

Madarro A., J.L. Pena, J.L. Lequerica, S. Valles, R. Gay and A. Flors. 1991. Partial purification and characterization of the cellulases from *Clostridium cellulolyticum*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **52** : 393-406.

Maeba P. and B.D. Sanwal. 1968. The regulation of pyruvate kinase of *Escherichia coli* by fructose diphosphate and adenylic acid. *J. Biol. Chem.* **243** : 448-450.

Magnuson K., M.R. Carey and J.E. Cronan. 1995. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **57** : 522-542.

Marchesi J.R., A.J. Weightmann, B.A. Cragg, R.J. Parkes and J.C. Fry. 2001. Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the cascadia margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34** : 221-228.

Matheron C., A.M. Delort, G. Gaudet, E. Forano and T. Liptaj. 1996. Simultaneous but differential metabolism of glucose and cellobiose in *Fibrobacter succinogenes* cells, studied in vivo ¹³C NMR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 74-81.

Matheron C., A.M. Delort, G. Gaudet, E. Forano and T. Liptaj. 1998. ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance study of glycogen futile cycling in strains of the genus *Fibrobacter*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 74-81.

Matheron C., A.M. Delort, G. Gaudet, T. Liptaj and E. Forano. 1999. Interaction between carbon and nitrogen metabolism in *Fibrobacter succinogenes* S85 : a ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance and enzymatic study. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 1941-1948.

Mayer F., M.P. Coughlan, Y. Mori and L.G. Ljungdahl. 1987. Macromolecular organization of the cellulolytic enzyme complex of *Clostridium thermocellum* as revealed by electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 2785-2792.

Meadow N.D., D.K. Fox and S. Roseman. 1990. The bacterial phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system. *Ann. Rev. Biochem.* **59** : 497-542.

Meinecke B., J. Bertram and G. Gottschalk. 1989. Purification and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*. *Arch. Microbiol.* **152** : 244-250.

Melville S.B., T.A. Michel and J.M. Macy. 1988. Regulation of carbon flow in *Selenomonas ruminantium* grown in glucose-limited continuous culture. *J. Bacteriol.* **170** : 5305-5311.

Méndez B.S., M.J. Pettinari, S.E. Ivanier, C.A. Ramos and F. Sineriz. 1991. *Clostridium thermopapyrolyticum* sp. nov., a cellulolytic thermophile. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41** : 281-283

Menzel K., A.P. Zeng, H. Biebl and W.D. Deckwer. 1996. Kinetic, dynamic and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: I. The phenomena and characterization of oscillation and hysteresis. *Biotechnol. Bioeng.* **52** : 549-560.

Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31** : 426-428.

- Ming-De D. and J.R. Coleman.** 1999. Ethanol Synthesis by Genetic Engineering in Cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 523-528.
- Miron J., D. Ben-Ghedalia and M. Morrison.** 2001. Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci.* **84** : 1294-1309.
- Mitchell W.J.** 1998. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv. Microbial Physiol.* **39** : 33-130.
- Mitchell W.J., K A. Albasheri and M. Yazdani.** 1995. Factors affecting utilization of carbohydrates by clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* **17** : 317-329.
- Mitchell P. and J. Moyle.** 1965. Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. *Nature* **208**: 1205-6.
- Mitsumiro M. and H. Minato.** 2000. Identification of the cellulose-binding domain of *Fibrobacter succinogenes* endoglucanase F. *FEMS Microbiol. Lett.* **183** : 99-103.
- Mitsumiro M., H. Minato, T. Sekizaki, I. Uchida and H. Ito.** 1996. Cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding the cellulose-binding protein 1 (CBP1) of *Fibrobacter succinogenes* S85. *FEMS Microbiol. Lett.* **139** : 43-50.
- Miyagi A., H. Ohta, T. Kodama, K. Fukui, K. Kato and T. Shimono.** 1994. Metabolic and energetic aspects of the growth response of *Streptococcus rattus* to environmental acidification in anaerobic continuous culture. *Microbiology* **140** : 1945-1952.
- Mladenovska Z., I.M. Mathrani and B.K. Ahring.** 1995. Isolation and characterization of *Caldicellulosiruptor lactoaceticus* sp. nov., an extremely thermophilic, cellulolytic anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* **163** : 223-230
- Monties, B.** 1980. Les lignines. Dans : *Les polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés.* (B. Monties ed.), p. 122-155. Gauthier-Villars, Paris.
- Monod J.** 1949. The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* **3** : 371-394.
- Monod J.** 1950. La technique de culture continue. Théorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur.* **79** : 390-410.
- Monot F., J.M. Engasser and H. Petitdemange.** 1984. Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19** : 422-426.
- Monserrate E., S.B. Leschine and E. Canale-Parola.** 2001. *Clostridium hungatei* sp. nov., a mesophilic N₂-fixing cellulolytic bacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51** : 123-132.
- Mokrasch L.C.** 1967. Use of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid for the coestimation of amines, amino acids and proteins in mixtures. *Anal. Biochem.* **18** : 64-71.
- Morrison M., R.I. Mackie and A. Kistner.** 1990. 3-phenylpropanoic acid improves the affinity of *Ruminococcus albus* for cellulose in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 3220-3222.
- Mortenson L.E., R.C. Valentine and J.E. Carnahan.** 1962. An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7** : 448-452.
- 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.
- Mortlock R.P., R.C. Valentine and R.S. Wolf.** 1959. Carbon dioxide activation in the pyruvate clastic system of *Clostridium butyricum*. *J. Biol. Chem.* **234** : 1653-1656.
- Morvan B., F. Rieu-Lesme, G. Fonty and P. Gouet.** 1996. *In vitro* interactions between rumen H₂-producing cellulolytic microorganisms and H₂-utilizing acetogenic and sulfate reducing bacteria. *Anaerobe* **2** : 175-180.
- Mosbah A., A. Belaich, O. Bornet, J.P. Bélaich, B. Henrissat and H. Darbon.** 2000. Solution structure of the module X2-1 of unknown function of the cellulosomal scaffolding protein CipC of *Clostridium cellulolyticum*. *J. Mol. Biol.* **304** : 201-217.
- Mouhand-Oussaid O., S. Payot, E. Guedon, A. Youyou and H. Petitdemange.** 1999. The extracellular xylan degradative system in *Clostridium cellulolyticum* cultivated on xylan :evidence for cell-free cellulosome production. *J. Bacteriol.* **181** : 1035-4040.
- Moulis J.M., V. Davasse, J. Meyer and J. Gaillard.** 1996. Molecular mechanism of pyruvate-ferredoxin oxidoreductases based on data obtained with the *Clostridium pasteurianum* enzyme. *FEBS Lett.* **380** : 287-290.
- Mourino F., R. Akkarawongsa and P.J. Weimer.** 2001. Initial pH as determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Dairy Sci.* **84** : 848-859.

Mullings R. and J.H. Parish. 1984. Mesophilic aerobic Gram negative cellulose degrading bacteria from aquatic habitats and soils. *J. Appl. Bacteriol.* **57** : 455-468.

Murray W. D., L. C. Sowden and J. R. Colvin. 1984. *Bacteroides cellulosolvers* sp. nov., a cellulolytic species from sewage sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34** : 185-187.

N

Nair R.V, E.M. Green, D.E. Watson, G.N. Bennett and E.T. Papoutsakis. 1999. Regulation of the sol locus genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by a putative transcriptional repressor. *J. Bacteriol.* **181** : 319-30.

Neijssel O.M., E.T. Buurman and M.J. Teixeira de Mattos. 1990. The role of futile cycles in the energetics of bacterial growth. *Biochim. Biophys. Acta.* **1018** : 252-255.

Neijssel O.M. and D.W Tempest. 1975. The regulation of carbohydrate metabolism in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 organisms growing in chemostat culture. *Arch. Microbiol. Physiol.* **106** : 251-258.

Neijssel O.M. and D.W Tempest. 1976. Bioenergetics aspects of aerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in carbon-limited and carbon-sufficient culture. *Arch. Microbiol. Physiol.* **107** : 215-221.

Newbold C.J, P.W. Griffin and R.J. Wallace. 1989. Interaction between rumen bacteria and ciliate protozoa in their attachment to barley straw. *Lett. Appl. Microbiol.* **8** : 63-66.

Ng T., P.J. Weimer and J.G. Zeikus. 1977. Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum*. *Arch. Microbiol.* **114** : 1-7.

Ng T. and J. G. Zeikus. 1982. Differential metabolism of cellobiose and glucose by *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. Bacteriol.* **150** : 1391-1399.

Nochur S.V., M.F. Roberts and A.L. Demain. 1990. Mutation of *Clostridium thermocellum* in the presence of certain carbon sources. *FEMS Microbiol. Lett.* **71** : 199-204.

Nochur S.V., A.L. Demain and M.F. Roberts. 1992. Carbohydrate utilization by *Clostridium thermocellum* : importance of internal pH in regulating growth. *Enz. Microbiol. Technol.* **14** : 338-349.

Nolling J., G. Breton, M.V. Omelchenko, K.S. Makarova, Q. Zeng, R. Gibson, H.M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, Y.I. Wolf, R.L. Tatusov, F. Sbathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M.J. Daly, G.N. Bennett, E.V. Koonin and D.R. Smith. 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **183** : 4823-4838.

Norsker M., L. Bloch and J. Adler-Nissen. 1999. Enzymatic degradation of plant cell wall polysaccharides : kinetics effect of competitive adsorption. *Nahrung* **43** : 307-310.

O

Ohmiya K., K. Nokura and S. Shimizu. 1983. Enhancement of cellulose degradation by *Ruminococcus albus* at high cellulose concentration. *J. Ferment. Technol.* **61** : 25-30.

Ohmiya K., K. Sakka, S. Karita and T. Kimura. 1997. Structure of cellulases and their applications. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **14** : 365-414.

Ohta K., D.S. Beall, J.P. Mejia, K.T. Shanmugam and L.O. Ingram. 1991a. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 893-900.

Ohta K., D.S. Beall, J.P. Mejia, K.T. Shanmugam and L.O. Ingram. 1991b. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 2810-2815.

Onodera R., K. Murakami and K. Ogawa. 1988a. Cellulose-degrading enzyme activities of mixed rumen ciliate protozoa from goats. *Agric. Biol. Chem.* **52** : 2639-2640.

Onodera R., N. Yamasaki and K. Murakami. 1988b. Effect of inhibition by ciliate protozoa on the digestion of fibrous materials in vivo in the rumen of goats and in an in vitro rumen microbial ecosystem. *Agric. Biol. Chem.* **52** : 2635-2637.

Orpin C.G. 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* **10** : 121-143.

Ostergaard S., L. Olsson and J. Nielsen. 2000. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64** : 34-50.

O'Sullivan E. and S. Condon. 1999. Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH and ATP and H⁺-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 2287-2293.

P

Pagès S., A. Bélaïch, H. P. Fierobe, C. Tardif, C. Gaudin and J. P. Bélaïch. 1999. Sequence analysis of scaffolding protein CipC and ORFXp, a new cohesin-containing protein in *Clostridium cellulolyticum* : comparison of various cohesin domains and subcellular localisation of ORFXp. *J. Bacteriol.* **181** : 1801-1810.

Pagès S., L. Gal, A. Bélaïch, C. Gaudin, C. Tardif and J. P. Bélaïch. 1996. Interaction between the endoglucanase CelA and the scaffolding protein Cip of the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome. *J. Bacteriol.* **178** : 2279-2286.

Pagès S., L. Gal, A. Bélaïch, C. Gaudin, C. Tardif and J. P. Bélaïch. 1997. Role of the scaffolding protein CipC of *Clostridium cellulolyticum* in cellulose degradation. *J. Bacteriol.* **179** : 2810-2816.

Palop., M. L. L., S. Valles, F. Piñaga and A. Flors. 1989. Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium celerecrescens* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39** : 68-71.

Papoutsakis E.T. 1984. Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **26** : 174-187.

Papoutsakis E.T. and C.L. Meyer. 1985. Equations and calculations of product yields and preferred pathways for butanediol and mixed-acid fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:50-66.

Park J.T. and M.J. Johnson. 1949. A submicro-determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **181** : 149-151.

Patel G.B., A.W. Kahn, B.J. Agnew and J.R. Colvin. 1980. Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic microorganism, *Acetivibrio cellulolyticus* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30** : 179-185.

Patni N.J. and J. K. Alexander. 1971. Utilization of glucose by *Clostridium thermocellum* : presence of glucokinase and other glycolytic enzymes in cell extracts. *J. Bacteriol.* **105** : 220-225.

Pavlostathis S.G., T.L. Miller and M.J. Wolin. 1988a. Fermentation of insoluble cellulose by continuous cultures of *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 2655-2659.

Pavlostathis S.G., T.L. Miller and M.J. Wolin. 1988b. Kinetics of insoluble cellulose fermentation by continuous cultures of *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 2655-2659.

Pavlostathis S.G., T.L. Miller and M.J. Wolin. 1990. Cellulose fermentation by continuous cultures of *Ruminococcus albus* and *Methanobrevibacter smithii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33** : 109-116.

Payot S. 1999. Etude des conditions physiologiques influençant la croissance, le catabolisme du cellobiose et la sporulation de *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. Thèse, Université de Nancy I, Nancy, France.

Payot S., E. Guedon, C. Cailliez, E. Gelhaye and H. Petitdemange. 1998. Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth. *Microbiology.* **144** : 375-384.

Payot S., E. Guedon, M. Desvaux, E. Gelhaye and E. Petitdemange. 1999a. Effect of dilution rate, cellobiose and ammonium availabilities on *Clostridium cellulolyticum* sporulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** : 670-674.

Payot S., E. Guedon, E. Gelhaye and H. Petitdemange. 1999b. Induction of lactate production associated with a decreased in NADH cell content enables growth resumption of *Clostridium cellulolyticum* in batch cultures on cellobiose. *Res. Microbiol.* **150** : 465-473.

Peck H.D. and H.A. Gest. 1956. A new procedure for assay of bacterial hydrogenases. *J. Bacteriol.* **71** : 70-80.

Peck H.D. and M. Odom. 1981. Hydrogen cycling in *Desulfovibrio* : A new mechanism for energy coupling in anaerobic microorganisms. Dans : *Microbial Mats : Stromatolites*. (R. Alan ed.), p. 215-243. Wiley-Liss, New-York, NY.

Pereira A.N., M. Mobedshashi and M.R. Ladish. 1988. Preparation of cellodextrins. *Methods Enzymol.* **160** : 26-45.

Perito B., E. Hanhart, T. Irdani, M. Iqbal, A.J. McCarthy and G. Mastromei. 1994. Characterization and sequence analysis of a *Streptomyces rochei* A2 endoglucanase-encoding gene. *Gene* **148** : 119-124.

Petitdemange H. 1976. Etude de l'oxydoreduction des nucleotides pyridiniques par les enzymes à ferrédoxine chez les clostridia du groupe des butyriques. Thèse de Doctorat, Université de Nancy I.

Petitdemange H., M. Bellanger, D. Lambert and R. Gay. 1971a. Activité NAD et NADP ferrédoxine réductasiques des extraits acellulaires de clostridia du groupe des butyriques. *C. R. Acad. Sci.* **272** : 2840-2843.

- Petitdemange H., M. Bellanger, D. Lambert and R. Gay.** 1971b. Importance de l'activité NAD-ferrédoxine réductasique chez les clostridia du groupe des butyriques. *C. R. Acad. Sci.* **273** : 985-988.
- Petitdemange E., F. Caillet, J. Giallo and C. Gaudin.** 1984. *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic mesophilic species from decayed grass. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34** : 155-159.
- Petitdemange H., C. Cherrier, G. Raval and R. Gay.** 1976. Regulation of the NADH and NADPH-ferrédoxin oxidoreductases in clostridia of the butyric group. *Biochim. Biophys. Acta.* **421** : 334-347.
- Petitdemange E., T. Tchunden, S. Valles, H. Pirson, G. Raval and R. Gay.** 1992. Effect of carbon sources on cellulase production by *Clostridium cellulolyticum*. *Biomass and Bioenergy.* **3** : 393-402.
- Pollack H.** 1984. Biological waste disposal from slaughterhouses. In : *Anaerobic digestion and carbohydrate hydrolysis of waste.* (GL Ferrero, MP Ferranti and H Naveau eds.), pp. 323-330. Elsevier Applied Science Publishers, London, England.
- Postgate J.R.** 1982. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Pirt S.J.** 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, U.K.
- Pohlschröder M, E. Canale-Parola and S.B. Leschine.** 1995. Ultrastructural diversity of the cellulase complexes of *Clostridium papyrosolvens* C7. *J Bacteriol* **177**: 6625-6629
- Postma P.W., J.W. Lengeler and G.R. Jacobson.** 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57** : 543-594.
- Prasad C. and E. Freese.** 1974. Cell lysis of *Bacillus subtilis* caused by intracellular accumulation of glucose-1-phosphate. *J. Bacteriol.* **118** : 1111-1122.
- Preiss J.** 1984. Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **38** : 419-458.
- Preiss J. and T. Romeo.** 1989. Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. *Adv. Microb. Physiol.* **30** : 183:233.
- Preiss J.** 1996. Regulation of glycogen. Dans : *Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology.* 2nd ed. Vol 1. (F.C. Neidhart, R. Curtis, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikof, M. Riley, M. Schaechter and H.E. Umbarger ed.), p. 1015-1024. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Prins, R.A., F. Van Vugt, R.E. Hungate and C.J. Vorstenbosch.** 1972. A comparison of strains of *Eubacterium cellulosolvens* from the rumen. *Antonie Leeuwenhoek* **38** : 153-161.

R

- Rafter G.W and S.p. Colowick.** 1957. Enzymatic preparation of DPNH and TPNH. *Methods Enzymol.* **3** : 887-899.
- Rainey F.A., A.M. Donnison, P.H. Janssen, D. Saul, A. Rodrigo, P.L. Bergquist, R.M. Daniel, E. Stackebrandt and H.W. Morgan.** 1994. Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov.: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **120** : 263-266
- Rainey, F.A. P.H. Janssen, H. W. Morgan and Stackebrandt.** 1993a. A biphasic approach to the determination of the phenotypic and genotypic diversity of some anaerobic, cellulolytic, thermophilic rod-shaped bacteria. *Antonie Leeuwenhoek.* **64** :341-355.
- Rainey, F. A. and E. Stackebrandt.** 1993. 16S rRNA analysis reveals phylogenetic diversity among the polysaccharolytic clostridia. *FEMS Microbiol. Lett.* **113**: 125-128.
- Rainey F.A., N.L. Ward, H.W. Morgan, R. Toalster and E. Stackebrandt.** 1993b. Phylogenetic analysis of anaerobic thermophilic bacteria: aid for their reclassification. *J. Bacteriol.* **175**:4772-4779.
- Ralph J., J.J. MacKay, R.D. Hatfield, D.M. O'Malley, R.W. Whetten and R.R. Sederoff.** 2001a. Abnormal lignin in a loblolly pine mutant. *Science.* **277**: 235-239.
- Ralph J., C. Lapierre, J.M. Marita, H. Kim, F. Lu, R.D. Hatfield, S. Ralph, C. Chapple, R. Franke, M.R. Hemm, J. Van Doorselaere, R.R. Sederoff, D.M. O'Malley, J.T. Scott, J.J. MacKay, N. Yahiaoui, A.M. Boudet, M. Pean, G. Pilate, L. Jouanin and W. Boerjan.** 2001b. Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochemistry.* **57**: 993-1003.
- Ravagnani A., K.C. Jennert, E. Steiner, R. Grunberg, J.R. Jefferies, S.R. Wilkinson, D.I. Young, E.C. Tidswell, D.P. Brown, P. Youngman, J.G. Morris and M. Young.** 2000. SpoA directly controls the switch from acid to solvent production in solvent-forming clostridia. *Mol. Microbiol.* **37**: 1172-1185.

- Reverbel-Leroy C., A. Bélaïch, A. Bernadac, C. Gaudin, J.P. Bélaïch and C. Tardif.** 1996. Molecular study and overexpression of the *Clostridium cellulolyticum* celf cellulase gene in *Escherichia coli*. *Microbiology*. **142** : 1013-1023.
- Reverbel-Leroy C., S. Pagès, A. Bélaïch, J.P. Bélaïch and C. Tardif.** 1997. The processive endocellulase Celf, a major component of the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome : purification and characterization of the recombinant form. *J. Bacteriol.* **179** : 46-52.
- Riebeling V. and K. Jungermann.** 1976. Properties and function of clostridial membrane ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* **430** : 434-444.
- Robinson J.A. and J.M. Tiedje.** 1984. Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H₂ under resting and growing conditions. *Arch. Microbiol.* **137** : 26-32.
- Rogers P.** 1986. Genetics and biochemistry of *Clostridium* relevant to development of fermentation processes. *Adv. Appl. Microbiol.* **31** : 1-60.
- Rogers P. and G. Gottschalk.** 1993. Biochemistry and regulation of acid and solvent production in clostridia. Dans : *The Clostridia and Biotechnology* (D.R. Woods ed.), p. 25-50. Butterworth-heinemann, Stoneham, MA.
- Roland J.C.** 1980. L'ultrastructure et texture des polysaccharides dans la paroi des cellules végétales. Dans : *Les polymères végétaux : polymères pariétaux at alimentaires non azotés.* (B. Montiès ed.), p. 46-65. Gauthier-Villars, Paris.
- Russell J.B.** 1985. Fermentation of cellodextrins by cellulolytic and non-cellulolytic rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **49** : 572-576.
- Russell J.B.** 1986. Heat production by ruminal bacteria in continuous culture relationship to maintenance energy. *J. Bacteriol.* **168** : 694-701.
- Russell J.B.** 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH : anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Microbiol.* **73** : 363-370.
- Russell J.B.** 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* **76** : 1955-1963.
- Russell J.B., D.R. Bond and G. Cook.** 1996. The fructose diphosphate/phosphate regulation of carbohydrate metabolism in low G+C Gram positive anaerobes. *Res. Microbiol.* **147** : 528-534.
- Russell J.B. and F. Diez-Gonzalez.** 1998. The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv. Microb. Physiol.* **39** : 205-234.
- Russell J.B. and D.B. Dombrowski.** 1980. The effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **39** : 604-610.
- Russell J.B. and T Hino.** 1985. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *J. Dairy Sci.* **68** : 1712-1721.
- Russell J.B. and G. Cook.** 1995. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* **59** : 48-62.
- Russell J.B. and J.L. Rychlik.** 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* **292** : 1119-1122.
- Russell J.B. and D.B. Wilson.** 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* **79** : 1503-1509.

S

- Salamitou S., M. Lemaire, T. Fujino, H. Ohayon, P. Gounon, P. Béguin and J.P. Aubert.** 1994. Subcellular localization of *Clostridium thermocellum* ORF3p, a protein carrying a receptor for the docking sequence borne by the catalytic components of the cellulosome. *J. Bacteriol.* **176** : 2828-2834.
- Sanwal B.D.** 1970. Allosteric control of amphibolic pathway in bacteria. *Bacteriol. Rev.* **34** : 20-39.
- Sarko A.** 1978. What is the crystalline structure of cellulose ? *Tappi J.* **61** : 59-61.
- Sarko A.** 2000. Advances in solid state structural studies of cellulose: a brief review. Dans : *Wood and cellulose: building blocks for chemicals, fuels and advanced materials. 2nd annual partnership for environmental improvement and economic development conference.* (K. Lambrych ed.), p. 1-4. State University of New York Press, New-York, NY.
- Scalbert, A., B. Monties, J. Y. Lallemand, Y. Guittet and C. Rolando.** 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignins fractions from wheat straw. *Phytochemistry.* **24** : 1359-1362.

- Schellhorn H.E. and C.W. Forsberg.** 1984. Multiplicity of extracellular β -(1,4)-endoglucanases of *Bacteroides succinogenes* S85. *Can. J. Microbiol.* **30** : 930-937.
- Schneider E. and S. Hunke.** 1998. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* **22** : 1-20.
- Schrempf H. and S. Walter.** 1995. The cellulolytic system of *Streptomyces reticuli*. *Int. J. Biol. Macromol.* **17** : 353-355
- Schumann P., N. Weiss and E. Stackebrandt.** 2001. Reclassification of *Cellulomonas cellulans* (Stackebrandt and Keddie 1986) as *Cellulimicrobium cellulans* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51** : 1007-1010.
- Schülein M.** 2000. Protein engineering of cellulases. *Biochem. Biophys. Acta* **1543** : 239-252.
- Schulze E.** 1891. Information regarding chemical composition of plant cell membrane. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **24** : 2277-2287.
- Schwarz W.H.** 2001a. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56** : 634-649.
- Schwarz W.H.** 2001b. An updated list of all presently known truly cellulolytic bacteria. http://www.biol.chemie.Tu-muenchen.de/microbio/schwarz2/index_e.html
- Schwarz W.H., K. Bronnenmeier, B. Landmann, G. Wanner, W.L. Staudenbauer, N. Kurose and T. Takayama.** 1995. Molecular characterization of four strains of the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59** : 1661-1665
- Shi Y., C.L. Odt and P.J. Weimer.** 1997. Competition for cellulose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 734-742.
- Shi Y. and P.J. Weimer.** 1992. Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 2583-2591.
- Shima S., Y. Igarashi and T. Kodama.** 1991. Nucléotide sequence analysis of the endoglucanase-encoding gene, *celCCD*, of *Clostridium cellulolyticum*. *Gene* **104** : 33-38.
- Shinmyo A.D., D.V. Garcia-Martinez and A.L. Demain.** 1979. Studies on the extracellular cellulolytic enzyme complex produced by *Clostridium thermocellum*. *J. Appl. Biochem.* **1** : 202-209.
- Shoham Y., R. Lamed and E.A. Bayer.** 1999. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol.* **7** : 275-281.
- Shoseyov O., M. Takagi, M.A. Goldstein and R.H. Doi.** 1992. Primary sequence analysis of *Clostridium cellulovorans* cellulose binding protein A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89** : 3483-3487.
- Sisson W.A.** 1941. Some X-ray observation regarding the membrane structure of *Halicystis*. *Contrib. Boyce thompson Inst.* **12** : 31-44.
- Sleat R. and R. Mah.** 1985. *Clostridium populeti* sp. nov., a cellulolytic species from a woody-biomass digester. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35** : 160-163.
- Sleat R., R. Mah and R. Robinson.** 1984. Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium : *Clostridium cellulovorans* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **48** : 88-93.
- Spivey M.J.** 1978. The acetone/butanol/ethanol fermentation. *Proc. Biochem.* **13** : 2-5.
- Stackebrandt E., I. Kramer, J. Swiderski and H. Hippe.** 1999. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **24** : 253-258.
- Stahlberg J., G. Johansson and G. Pettersson.** 1991. A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose based on the two-domain structure of cellobiohydrolase I. *Biotechnology* **9** : 286-289.
- Stephanopoulos G. and J.J. Vallino.** 1991. Network rigidity and metabolic engineering in metabolic over production. *Science.* **252** : 1675-1681.
- Stewart C.S.** 1977. Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* **33** : 497-502.
- Stouthamer A.H.** 1969. Determination and significance of molar growth yield. *Methods Microbiol.* **1** : 629-663.
- Stouthamer A.H.** 1973. A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. *Antonie Leewenhoek* **39** : 545-565.

Stouthamer A.H and C. Bettenhausen. 1973. Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. *Biochem. Biophys. Acta* **301** : 53-70.

Strobel H. J. 1995. Growth of the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum* in continuous culture. *Curr. Microbiol.* **31** : 210-214.

Strobel H.J., F.C. Caldwell and K.A. Dawson. 1995. Carbohydrate transport by the anaerobic thermophile *Clostridium thermocellum* LQRI. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 4012-4015.

Stülke J. and W. Hillen. 1998. Coupling physiology and gene regulation in bacteria : the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. *Naturwissenschaften.* **85** : 583-592.

Stülke J. and W. Hillen. 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **2** : 195-201.

Sukhumavasi J., K. Ohmiya, S. Shimizu and K. Ueno. 1988. *Clostridium josui* sp. nov., a cellulolytic, moderate thermophilic species from Thai compost. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38** : 179-182.

Sunna A., M. Moracci, M. Rossi and G. Antranikian. 1997. Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles* **1** : 2-13.

Svetlichnyi V.A., T.P. Svetlichnaya, N.A. Chernykh and G.A. Zavarzin. 1990. *Anaerocellum thermophilum* gen. nov., sp. nov.: an extremely thermophilic cellulolytic eubacterium isolated from hot springs in the valley of geysers. *Microbiol. Russ.* **59** : 598-604

T

Taguchi K. Yamada, K. Hasegawa, T. Taki-Saito and K. Hara. 1996. Continuous hydrogen production by *Clostridium* sp. Strain no. 2 from cellulose hydrolysate in an aqueous two-phase system. *J. Ferment. Bioeng.* **82** : 80-83.

Tamaru Y. and R.H. Doi. 1999. Three surface layer homology domains at the N terminus of the *Clostridium cellulovorans* major cellulosomal subunit EngE. *J. Bacteriol.* **181** : 3270-3276.

Tamaru Y., S. Karita, A. Ibrahim, H. Chan and R.H. Doi. 2000. A large gene cluster for the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *J. Bacteriol.* **182** : 5906-5910.

Tanaka K., T. Kawaguchi, Y. Imada, T. Ooi and M. Arai. 1995. Purification and properties of cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum*. *J. Ferment. Bioeng.* **79** : 212-216.

Teeri T.T. 1997. Crystalline cellulose degradation : new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* **15** : 160-167.

Tempest D.W. 1970. The continuous cultivation of microorganism. I. Theory of the chemostat. *Methods Microbiol.* **2** : 259-276.

Tempest D. W. and O. M. Neijssel. 1984. The status of Y_{ATP} and maintenance energy as biologically interpretable phenomena. *Annu. Rev. Microbiol.* **38** : 459-486.

Terracciano J.S. and E.R. Kashket. 1986. Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52** : 86-91.

Thauer R.K., K. Jungermann and K. Decker. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41** : 100-180.

Thauer R.K., K. Jungermann, E. Rupprecht and K. Decker. 1969. Hydrogen formation from NADH in cell-free extracts of *Clostridium kluyveri*. Acetyl coenzyme A requirement and ferredoxin dependence. *FEBS Lett.* **4** : 108-112.

Thauer R.K., E. Rupprecht, C. Ohrloff, K. Jungermann and K. Decker. 1971. Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-ferredoxin reductase system in *Clostridium kluyveri*. *J. Biol. Chem.* **246** : 954-959.

Thayer D.W., S.V. Lowther and J.G. Phillips. 1984. Cellulolytic activities of the genus *Cellulomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34** : 432-438

Thibault J.F. 1980. Les substances pectiques. Dans : *Les polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés.* (B. Montié ed.), p. 232-251. Gauthier-Villars, Paris.

Thompson J.A. 1993. Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **104** : 65-82.

Thornalley P.J. 1990. The glyoxalase system : new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* **269** : 1-11.

Tomme P., R.A. J. Warren and N.R. Gilkes. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **37** : 1-81.

Tubbs P.K. and P. B. Garland. 1969. Assay of coenzyme A and acyl derivatives. *Methods Enzymol.* **13** : 535-551.

U

Udegraff D.M. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Biochem.* **32** : 420-424.

V

Valentine R.C. 1964. Bacterial ferredoxin. *Bacteriol. Rev.* **28** : 497-517.

Varel V.H. 1989. Reisolation and characterisation of *Clostridium longisporum*, a ruminal spore forming cellulolytic anaerobe. *Arch. Microbiol.* **152** : 209-214.

Varel V.H, S.J. Fryda and I.M. Robinson. 1984. Cellulolytic bacteria from pig large intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* **47** : 219-221.

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

Vidrine J.G. and L.Y. Quinn. 1969. Utilisation of hexoses by *Clostridium thermocellum*. *Bacteriol. Proc.* 135.

Viljoen J.A., E.B. Fred and W.H. Peterson. 1926. The fermentation of cellulose by thermophilic bacteria. *J. Agric. Sci.* **16** : 1-17.

W

Wallace R.J. 1978. Control of lactate production by *Selenomonas ruminantium*: Homotropic activation of lactate dehydrogenase by pyruvate. *J. Gen. Microbiol.* **107** : 45-52.

Walsum G.P. and L.R. Lynd. 1998. Allocation of ATP synthesis of cells and hydrolytic enzymes in cellulolytic fermentative microorganisms : bioenergetics, kinetics and bioprocessing. *Biotechnol. Bioeng.* **58** : 316-320.

Wanner U. and T. Egli. 1990. Dynamics of microbial growth and cell composition in batch culture. *FEMS Microbiol. Rev.* **75** : 19-44.

Warren R.A.J. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* **50** : 183-212.

Warshaw J.E., S.B. Leschine and E. Canale-Parola. 1985. Anaerobic cellulolytic bacteria from wetwood of living trees. *Appl. Environ. Microbiol.* **50** : 807-811.

Wedekind K.J., H.R. Mansfield and L. Montgomery. 1988. Enumeration and isolation of cellulolytic and hemicellulolytic bacteria from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 1530-1535.

Weimer P.J. 1993. Effect of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose-fed continuous culture. *Arch. Microbiol.* **160** : 288-294.

Weimer, P.J. and J.G. Zeikus. 1977. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33** : 289-297.

Weimer P.J., A. D. French and T.A. Calamari. 1991a. Differential fermentation of cellulose allomorphs by ruminal cellulolytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 3101-3106.

Weimer P.J., J.M. Lopez-Guisa and A.D. French. 1990. Effects of cellulose fine structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 2421-2429.

Weimer P.J., Y. Shi and C.L. Odt. 1991b. A segmented gas/liquid delivery system for continuous culture of microorganisms on insoluble substrates and its use for growth of *Ruminococcus flavefaciens* on cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36** : 178-183.

Weimer P.J., J.M. Hackney, H.J.G. Jung and R.D. Hatfield. 2000. Fermentation of a bacterial cellulose/xylan composite by mixed ruminal microflora : implications for the role of polysaccharide matrix interactions in plant cell wall biodegradability. *J. Agric. Food Chem.* **48** : 1727-1733.

Wells J.E. and J.B. Russell. 1996. The effect of growth and starvation on the lysis of the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 1342-1346.

Monsieur DESVAUX Mickaël

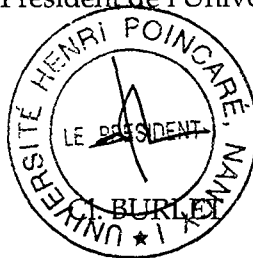
DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY-I

en BIOLOGIE STRUCTURALE, MOLECULAIRE & CELLULAIRE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 12 novembre 2001 n° 565

Le Président de l'Université



Résumé

Clostridium cellulolyticum est une bactérie cellulolytique anaérobie mésophile qui dégrade la cellulose grâce à un complexe multienzymatique extracellulaire, le cellulosome. L'analyse de son métabolisme a révélé que l'inhibition précoce de sa croissance observée depuis longtemps lors de cultures discontinues est due à un flux carboné entrant élevé. Cependant, les résultats de cette étude métabolique sont issus de cultures sur une cellodextrine soluble, le cellobiose, et sont supposés représentatifs d'une croissance sur cellulose.

Afin de savoir dans quelle mesure les résultats obtenus sur cellobiose sont transposables sur cellulose, des cultures discontinues et continues à flux segmentés ont été réalisées sur une cellulose native plus proche des composés lignocellulosiques rencontrés dans l'écosystème de *Clostridium cellulolyticum*. En culture discontinue, l'arrêt de croissance semble également être le résultat d'un flux carboné entrant élevé entraînant l'accumulation de composé(s) intracellulaire(s) inhibiteur(s). Par ailleurs, *Clostridium cellulolyticum* apparaît aussi sensible que les bactéries cellulolytiques du rumen à l'acidification du milieu de culture car elle ne peut croître à des pH significativement inférieurs à 6.

L'analyse des flux métaboliques en cultures continues sur cellulose en conditions de carbone limitant, d'ammonium limitant et aussi de substrats saturants a permis de montrer que (i) l'hydrolyse de la cellulose par le cellulosome introduit une régulation supplémentaire du flux carboné entrant, (ii) il y a d'autant plus de glucose 1-phosphate généré que la cellodextrine incorporée est longue, (iii) la phosphoglucomutase contrôle le flux carboné dirigé vers la glycolyse, (iv) le surplus de carbone est stocké transitoirement sous forme de glycogène, (v) le carrefour métabolique au niveau du pyruvate et de l'acétyl-CoA est capital dans le contrôle du flux électronique et énergétique de la cellule, (vi) les flux métaboliques restent globalement inférieurs à ceux obtenus sur cellobiose.

L'utilisation du cellobiose a permis de mettre en exergue des limitations métaboliques de *Clostridium cellulolyticum* mais lorsque les flux carbonés entrants sont particulièrement élevés ces régulations doivent être interprétées comme des distorsions du métabolisme induites par l'utilisation d'un substrat carboné soluble dont la nature physique est très éloignée de la cellulose native. *Clostridium cellulolyticum* apparaît bien adapté et même restreint à la fermentation de composés cellulosiques.

Mots-clés : *Clostridium cellulolyticum*, cellulose, cellobiose, culture continue, analyse métabolique, inhibition de croissance, flux carboné.