

Production d'isopropanol par des souches génétiquement modifiées de *Clostridium*



THESE 2008

Titre de la thèse	Production d'isopropanol par des souches génétiquement modifiées de <i>Clostridium</i> Production of isopropanol, butanol and ethanol by metabolic engineered <i>Clostridia</i>
Doctorant	Florent Collas
Université-Ecole doctorale	ABIES (Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé) - Paris Tech. Spécialité Microbiologie et Biologie moléculaire
Directeur de thèse	Dr. Claude Gaillardin (AgroParisTech)
Laboratoires d'accueil	- Département de Biotechnologie de IFP Energies nouvelles, Rueil-Malmaison, - Agrotechnical Technology and Food Science Group (A&F, Wageningen, Pays-Bas)
Responsables de thèse	- Rémy Marchal, IFPEN, Département de Biotechnologie, 1-4 Avenue de Bois-Préau, 92852 Rueil-Malmaison, - Ana M. Contreras et Pieternel Claassen, A&F, Food and Biobased Research, Biobased Product, Bornse Weilanden 9, 6708 WG, Wageningen, Pays-Bas
Durée	Trois ans (fin 2008 à fin 2011). Thèse soutenue le 14 novembre 2012

Résumé

Le di-isopropyl éther (DIPE) dont les MON et RON sont respectivement de 112 et 98, est un additif possible des essences. La synthèse chimique de ce composé met en jeu l'alcool isopropylique (IPA) dans la réaction de Williamson. Ce projet de thèse vise à produire l'IPA à partir des hexoses et pentoses de la biomasse, en utilisant des souches de *Clostridium* génétiquement modifiées.

Clostridium beijerinckii notamment utilise les sucres selon le métabolisme de la fermentation IBE (isopropanol, butanol, éthanol). Des mutants capables de produire sélectivement de l'IPA seront construits par mutagenèse dirigée, à partir de souches sauvages, dont les performances de production seront préalablement évaluées. La construction de la cassette de délétion s'appuiera sur le génome de *Clostridium acetobutylicum* dont la séquence est entièrement connue. La suppression des gènes de la β -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase et/ou de la crotonase conduisant au butyryl-CoA dans la voie de dégradation, devrait logiquement réorienter le flux métabolique du butanol vers l'IPA. Ce dernier produit étant moins toxique que le butanol pour les microorganismes, il est logique d'espérer atteindre des concentrations plus élevées d'IPA dans les milieux de culture.

La production d'IPA par le(s) mutant(s) a été étudiée en fermenteur, par cultures discontinues sur hexoses (glucose) et sur pentoses (xylose et arabinose).

Les travaux de construction génétique ont été effectués à A&F, Wageningen, Pays-Bas, et ceux de fermentation à l'IFPEN, Rueil-Malmaison.

Résultats

Les préoccupations écologiques et économiques suscitent un regain d'intérêt pour la fermentation productrice d'isopropanol, connue sous le nom de fermentation IBE (isopropanol, butanol et éthanol).

Chez les microorganismes excréant de l'isopropanol, l'acétone est hydrogénée via une réaction catalysée par une alcool déshydrogénase secondaire (s-Adh) codée par le gène adh. Les études cinétiques de l'enzyme s-Adh purifiée de *Clostridium beijerinckii* NRLL B593 ont confirmé que le substrat physiologique est bien l'acétone et non l'isopropanol.

L'optimisation de la production d'IBE par *C.beijerinckii* NRLL B593 a permis d'obtenir 13,2 g/l d'IBE dont 4,5 g/l d'isopropanol.

La production d'isopropanol a été ensuite étudiée chez *C. acetobutylicum* ATCC 824 en y clonant le gène de l'alcool déshydrogénase secondaire de la souche *C. beijerinckii* NRLL B593. Deux souches génétiquement modifiées ont été obtenues et capables de réduire en isopropanol plus de 95% de l'acétone formé. Pour ces deux souches de *C.acetobutylicum* modifiées, les productions d'IBE étaient de 17 g/l dont 6 g/l d'isopropanol, contre 20 g/l d'IBE (acétone, butanol et éthanol) dont 6 g/l d'acétone pour la souche sauvage.

Pour améliorer la production d'IBE des souches génétiquement modifiées, trois nouveaux plasmides furent construits, contenant les gènes des enzymes actives dans la conversion de l'acétoacétyl-CoA en acétone. Les nouvelles souches ainsi obtenues ont produit environ 24 g/l d'IBE dont un peu plus de 8 g/l d'isopropanol.

Les souches modifiées n'excrètent pas ou très peu d'acétoïne qu'elles réduisent en 2-3 butanediol, à la différence de la souche sauvage de *C. acetobutylicum* ATCC 824.

Livrables

Manuscrit de la thèse

[Page de couverture de la thèse](#)

Publications et communications

F. Collas et al. (2010). Improvement of isopropanol production from glucose by engineering of a *Clostridium* strain. Congrès Nederlandse Biotechnologische Vereniging, Delft (Pays-Bas), 11-12 Mars 2010

F. Collas et al. (2012). Simultaneous production of isopropanol, butanol, ethanol and 2,3-butanediol by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 engineered strains. [AMB Express, 2, 45, 1-10](#)

Contact

Rémy Marchal
IFP Énergies nouvelles

1-4 Avenue de Bois-Préau

92852 Rueil-Malmaison Cedex
remy.marchal@ifpen.fr