

STRUCTURE MOLÉCULAIRE DU β -D-GLUCANE EXOCELLULAIRE DE *Pediococcus* sp.

Rose-Marie CANAL-LLAUBERES, D. DUBOURDIEU, Béatrice RICHARD
et Aline LONVAUD-FUNEL

Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II,
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cédex (France)

Certaines bactéries lactiques du vin libèrent des polysaccharides qui induisent une importante élévation de viscosité. Elles sont responsables d'une maladie appelée maladie de la «graisse» ou des vins «filants» décrite pour la première fois par PAS-TEUR (1866). Au début du siècle, GAYON (1900) puis LABORDE (1904) se sont intéressés à l'isolement de ces bactéries et à la nature des colloïdes produits.

En 1988, LONVAUD-FUNEL et JOYEUX ont isolé et identifié quelques souches de bactéries lactiques du genre *Pediococcus* et reproduit la maladie sur milieu modèle. Nous rapportons ici la purification et la structure moléculaire du polysaccharide produit par ces souches ainsi que les conditions de culture favorisant sa biosynthèse (LLAUBERÈS, 1988).

I — PRODUCTION DU POLYSACCHARIDE

Les souches de pédiocoques isolées de vins filants (LONVAUD, 1986) sont cultivées sur milieu de Carr modifié, contenant 5 g de glucose par litre. Les polysaccharides sont dosés par chromatographie liquide haute pression de tamisage moléculaire (DUBOURDIEU et al., 1986).

La figure 1 représente la quantité de polysaccharides libérés, l'augmentation de viscosité du milieu et les paramètres de la culture. La teneur en polysaccharides après 10 jours de culture est de l'ordre de plusieurs dizaines de mg par litre et l'augmentation de viscosité relative correspondante est considérable.

Les teneurs en polysaccharides dépendent de la nature et de la concentration de la source carbonée utilisée comme substrat énergétique. Ainsi, sur milieu modèle où le glucose est remplacé par du fructose, un mélange d'autres oses ou en l'absence de sucre, la production de polysaccharides exocellulaires est limitée et l'augmentation de viscosité de la culture faible. La production de mucilage visqueux par ces souches de pédiocoques apparaît donc associée à un développement sur glucose.

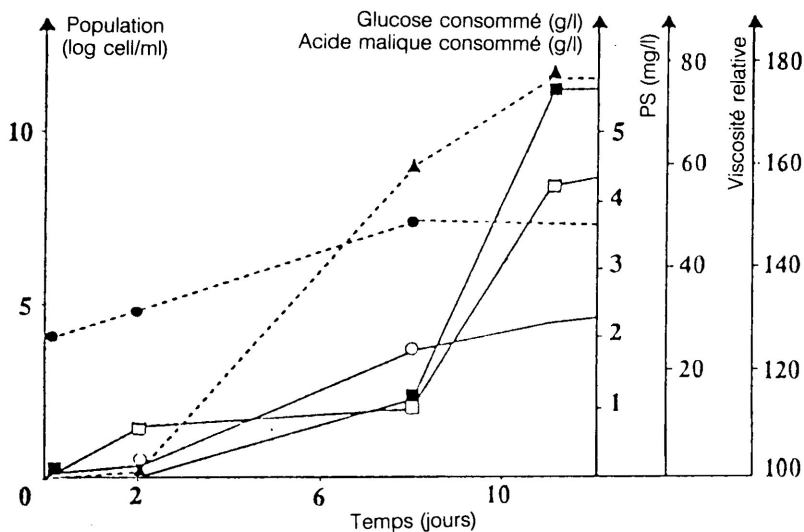


Fig. 1. — Culture de *Pediococcus* sp. sur glucose (5 g/l).
Variation de la population viable (●), des consommations en acide malique (▲) et en glucose (○),
de la viscosité relative (■) et de la production de polysaccharides (□).

II — PURIFICATION

Après douze jours de culture, les bactéries sont éliminées par centrifugation (7500 g, 20 mn) et les polysaccharides du milieu sont isolés par précipitation et lavages à l'éthanol ou par dialyse. Redissous dans l'eau par traitements aux ultra-sons, ils sont purifiés par chromatographie d'échange anionique (DEAE Sépharose CL 6 B).

Les analyses colorimétriques des sucres (méthode au phénol sulfurique) et des protéines (Lowry) du polysaccharide neutre ainsi que la détermination des oses monomères après hydrolyse acide et chromatographie en phase gazeuse sous forme de dérivés silylés montrent qu'il s'agit d'un glucane.

Son poids moléculaire moyen déterminé par tamisage moléculaire (Séphacryl S400) est voisin de 800000 Dalton.

III — STRUCTURE MOLÉCULAIRE

L'étude de la structure moléculaire s'appuie sur plusieurs techniques physico-chimiques : méthylation (PAZ-PARENTE et al., 1985), résonance magnétique nucléaire du ^{13}C et dégradation de Smith (JOHNSON et al., 1963).

Les six éthers méthyliques obtenus après perméthylation, méthanolyse et acétylation d'1 mg de polysaccharide purifié sont séparés par CPG et identifiés par spectrométrie de masse.

Le tableau I montre que les trois types de dérivés 0-méthyl-0-acétyl glucosides sont obtenus en proportions sensiblement équimoléculaires. Ils traduisent l'existence d'une structure ramifiée dont les points de branchement font intervenir des liaisons de type (1 → 2) sur une chaîne principale de type (1 → 3).

Identification par CPG des éthers méthyliques issus du perméthyl glucane de *Pediococcus* sp.

| Paramètres | Nature et position des substituants | | | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|---------|--------------------------|---------|--------------------------|---------|
| | Méthyl-2,3,4,6 | | Méthyl-2,4,6 acétyl-3 | | Méthyl-4,6 acétyl-2,3 | |
| | α | β | α | β | α | β |
| Temps de rétention (mn) | 16.6 | 14.5 | 28.0 | 24.8 | 31.7 | 30.8 |
| Hauteur des pics (cm) | 10.5 | 2.1 | 8.4 | 2.5 | 9.2 | 3.5 |
| Rapport molaire* | 1.1 | | 1 | | 1.1 | |

* Déterminé sur la base d'un résidu de triméthyl-acétyl-glucoside.

L'analyse du spectre de résonance magnétique nucléaire du ^{13}C du polysaccharide confirme la présence d'une unité trisaccharidique de répétition en configuration β . Il s'agirait donc d'un β (1 \rightarrow 3 : 1 \rightarrow 2) glucane dont la structure moléculaire de l'unité de répétition est schématisée sur la figure 2.

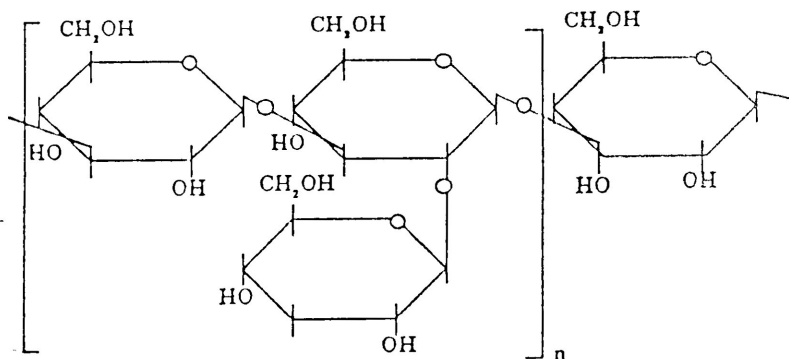


Fig. 2. — Hypothèse de structure moléculaire de l'unité de répétition du glucane exocellulaire de *Pediococcus* sp.

Cette hypothèse de structure est confirmée par l'étude des branchements latéraux de la molécule. La dégradation de Smith (oxydation périodique, réduction et hydrolyse ménagée) conduit en effet à un β (1 \rightarrow 3) glucane linéaire dont l'hydrolyse enzymatique par une *exo- β* (1 \rightarrow 3) glucanase (Glucanex) ne donne que du glucose.

Le β -glucane de *Pediococcus* sp. responsable d'une des formes de la maladie de la «graisse» présente donc une certaine similitude avec les scléroglycannes tels que le glucane de *Botrytis cinerea* ou cinéréane (DUBOURDIEU et al., 1981). La seule différence réside dans la nature β (1 \rightarrow 2) des branches latérales qui sont du type β (1 \rightarrow 6) pour le cinéréane. Cette différence permet d'expliquer que le β -glucane de la maladie de la «graisse» résiste à l'action des *exo- β* (1 \rightarrow 3) glucanases.

Note reçue le 21 novembre 1988.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DUBOURDIEU D., RIBÉREAU-GAYON P. et FOURNET B., 1981. Structure of the exocellular β -D-glucan from *Botrytis cinerea*. *Carbohydr. Res.*, **93**, 294-299.
- DUBOURDIEU D., LLAUBERÈS R.M. et OLLIVIER C., 1986. Estimation des constituants macromoléculaires des moûts et des vins par chromatographie liquide haute pression de tamisage moléculaire. *Connaissance Vigne Vin*, **20**, N° 2, 119-123.
- GAYON U., 1900. Maladie des vins. Progrès de la vinification. *Congrès international de viticulture, 13-17 mai, Paris. Société anonyme de publications périodiques*.
- JOHNSON J., KIRKWOOD J., MISAKI A., NELSON T.E., SCALETTI J.V. et SMITH F., 1963. Structure of a new glucan. *Chem. Ind. (London)*, 820-822.
- LABORDE J., 1904. Sur les ferments des vins gras ou filants. *Extrait des procès verbaux des séances de la société des sciences physiques et naturelles de Bordeaux, 21 juillet*.
- LLAUBERÈS R.M., 1988. Les polysaccharides sécrétés dans les vins par *Saccharomyces cerevisiae* et *Pediococcus* sp. *Thèse de Doctorat de l'Université de Bordeaux II*.
- LONVAUD-FUNEL A., 1986. Recherches sur les bactéries lactiques du vin. Fonctions métaboliques, croissance, génétique plasmidique. *Thèse Docteur ès-Sciences, Université de Bordeaux II*.
- LONVAUD-FUNEL A. et JOYEUX A., 1988. Étude d'une altération bactérienne des vins : la maladie des vins filants. *Sciences des Aliments*, **8**, 33-49.
- PASTEUR L., 1866. Études sur le vin. *Imprimerie Impériale, Paris*.
- PAZ-PARENTE J., CARDON P., LEROY Y., MONTREUIL J., FOURNET B., et RICARD G., 1985. A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methyl sulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.*, **141**, 41-47.