

Physiologie, métabolisme

Détection de bactéries lactiques produisant du 3-hydroxypropionaldéhyde (précurseur d'acroléine) à partir du glycérol par tests moléculaires

Olivier CLAISSE*, Aline LONVAUD-FUNEL

Laboratoire de Biotechnologie et Microbiologie Appliquée, Unité associée INRA,
Faculté d'œnologie, 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France

Abstract — Detection of lactic acid bacteria producing 3-hydroxypropionaldehyde (acrolein precursor) from glycerol by molecular tests. Glycerol, one of the major product of yeasts metabolism during cider and wine alcoholic fermentation is important for sensorial quality of fermented beverages. Some lactic acid bacteria convert glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde by glycerol dehydratase. This reaction originates acrolein which produces bitter compounds by combination with tannins. Thirty nine strains of lactic acid bacteria were isolated from spoiled ciders where glycerol was totally degraded. *Lactobacillus collinoides* was the dominant isolated species, *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus yamanashiensis* (*Lb. mali*) were also identified. Glycerol dehydratase activity was shown. Two oligonucleotide primers (GD1 and GD2) were chosen in the most conserved encoding region of one of the glycerol dehydratase subunit of *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella typhimurium* and *Clostridium pasteurianum*. The primers led to a 279 bp amplicon (GD) in PCR amplification with the genomic DNA of *Lb. collinoides* IOEB 9527 as template. The amino acid sequence deduced from the amplicon nucleotide sequence showed a very high similarity with the glycerol dehydratase genes of Gram negative and *Cl. pasteurianum* species. PCR using GD1 and GD2 primers, only revealed *Lb. collinoides* strains and *Lb. hilgardii* strains, which degrade glycerol. The amplified fragment was used as DNA probe in dot-blot hybridization with the genomic DNA of all the isolated strains from ciders. Only glycerol-degrading strains hybridized. The same probe allowed to isolate glycerol-degrading lactic acid bacteria strains from wine by colony hybridization. Moreover with GD1 and GD2 a 279 bp fragment was also amplified from genomic DNA of those wine strains. Some were *Lb. hilgardii* strains others could not be identified yet.

lactic acid bacteria / glycerol / acrolein

Résumé — Certaines bactéries lactiques peuvent transformer le glycérol en 3-hydroxypropionaldéhyde grâce à l'activité glycérol déshydratase. Cette réaction est à l'origine de l'acroléine qui donne des composés à goût amer par combinaison avec les tanins. Trente neuf souches de bactéries lactiques

* Correspondance et tirés-à-part
Tél. : (33) 5 56 84 64 69 ; fax : (33) 5 56 84 64 68 ; e-mail: olivier.claisse@oenologie.u-bordeaux2.fr

ont été isolées de cidres altérés dont le glycérol avait été totalement dégradé. *Lactobacillus collinoides* représentait l'espèce majoritaire. Deux amorces oligonucléotidiques (GD1 et GD2) ont été choisies dans les zones les plus conservées de la région codante de l'une des sous-unités de la glycérol déshydratase de *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella typhimurium* et *Clostridium pasteurianum*. Ces 2 amorces permettent l'amplification par PCR d'un fragment de 279 pb uniquement chez les souches qui dégradent le glycérol. La séquence d'acides aminés, déduite de la séquence d'ADN de l'amplifié, présente de fortes homologies avec celles codant une partie de la sous-unité α de la glycérol déshydratase des espèces à Gram négatif et *Clostridium pasteurianum*. Seuls les ADN des souches isolées de cidres qui dégradent le glycérol hybrident avec le fragment amplifié utilisé comme sonde (GD). L'utilisation de cette sonde en hybridation sur colonies a permis d'isoler du vin des souches de bactéries lactiques qui dégradent le glycérol.

bactérie lactique / glycérol / acroléine

1. INTRODUCTION

Le glycérol et l'éthanol sont les produits majoritaires du métabolisme des levures pendant la fermentation alcoolique des cidres et des vins. Le glycérol joue un rôle important au niveau des qualités sensorielles des boissons fermentées. Dès 1866, Pasteur [14] décrit l'altération d'un vin appelée « amertume ». Plus tard Rentschler et Tanner [15] démontrent la combinaison des tanins avec l'acroléine issue du métabolisme du glycérol conduisant à la formation de composés à goût amer. L'acroléine décrite comme composant d'altération des vins n'est pas directement produite à partir du glycérol mais provient du 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA) spontanément et surtout par chauffage [20]. Ceci implique que le 3-HPA qui n'est pas réduit en 1,3-propanediol se transforme en acroléine pendant la distillation nécessaire à la détermination analytique, et explique la présence d'acroléine dans les spiritueux produits à partir de vin ou de cidre. L'enzyme responsable de la formation de 3-HPA est la glycérol déshydratase coenzyme B12-dépendante, décrite chez *Lactobacillus* 208-A [19], chez *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus buchneri* [16]. Ces souches ont été respectivement isolées de vin altéré et de la panification. Pour *Lb. brevis*, l'activité glycérol déshydratase est décelée quand les cellules sont

cultivées en présence de glycérol et de fructose ou glucose, et en présence de fructose seul. Ces bactéries transforment le glycérol en 3-HPA, lui-même est réduit en 1,3-propanediol par la 1,3-propanediol déshydrogénase grâce à l'oxydation de NADH,H⁺.

La glycérol déshydratase a également été décrite chez des microorganismes à Gram négatif et Gram positif tels que *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter intermedium* [24], *Enterobacter agglomerans* [3], *Salmonella typhimurium* [4], *Clostridium pasteurianum* et *Clostridium butyricum* [10]. La glycérol déshydratase est l'une des 4 enzymes du régulon appelé *dha*. Le métabolisme du glycérol est composé d'une voie oxydative, avec la glycérol déshydrogénase (*dhaD*) et la dihydroxyacétone kinase (*dhaK*) qui transforme le glycérol en dihydroxyacétone phosphate précurseur de la voie de la glycolyse, et une voie de réduction avec la glycérol déshydratase (*dhaB*) et la 1,3-propanediol déshydrogénase (*dhaT*) qui forme le 1,3-propanediol. La totalité du régulon *dha* a été clonée et exprimée chez *E. coli* sous forme d'une banque d'ADN de *Cit. freundii* [5]. La glycérol déshydratase de *Cit. freundii*, clonée par Seyfried et al. [17], correspond à 3 sous-unités protéiques α , β et γ codées par 3 gènes *dhaB*, *dhaC* et *dhaE* suivis par l'*orfZ*, qui n'est pas nécessaire à l'activité

enzymatique. Cette organisation est également trouvée chez *Cl. pasteurianum* [13], mais le reste de l'organisation génétique de la voie de réduction n'est pas identique [6]. Chez *Kl. pneumoniae* les gènes *dhaB* et *dhaT* sont également organisés en opéron ; leur expression chez de nombreux procaryotes permet de produire de façon industrielle du 1,3-propanediol sous forme monomérique pour la synthèse de polyesters [18].

La glycérol déshydratase de *Lactobacillus reuteri* s'agence sous forme d'un tétramère de $52 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ [22], alors qu'il s'agit d'un complexe $\alpha\beta\gamma_2$ d'approximativement $60,5$ (α), 20 (β) et 16 (γ) $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour l'enzyme de *Cl. pasteurianum* et *Cit. freundii* [6].

Le but de cette étude était d'isoler une sonde d'ADN spécifique qui permette de détecter des souches indésirables possédant le gène de la glycérol déshydratase. Le gène ou une portion de ce gène, correspondant à l'une des sous-unités de cette enzyme, paraissait un très bon outil de détection des souches de bactéries lactiques qui transforment le glycérol en 3-HPA.

2. CAPACITÉ DE SOUCHES DE BACTÉRIES LACTIQUES DES CIDRES À DÉGRADER LE GLYCÉROL

2.1. Isolement et identification

Trente neuf souches ont été isolées de cidres fournis par l'ADRIA-Normandie dont la concentration en glycérol était faible ou nulle. L'acroléine était également détectée. Elles ont été cultivées et isolées sur milieu MRS [7]. Du cidre lyophilisé était ajouté au milieu MRS pour les souches isolées par l'ADRIA-Normandie. La capacité des trente neuf souches et de la souche *Lactobacillus collinoides* ATCC 27612 à dégrader le glycérol a été testée dans le milieu MFG en conditions d'anaérobiose (flacons pleins hermétiquement bouchés). Ce milieu contenait pour 1 L d'eau distillée : hydrolysats de

caséine, 5 g ; extrait de levure, 4 g ; KH_2PO_4 , 0,55 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,125 g ; KCl, 0,425 g ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3mg ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,125 g ; fructose, 1 g ; glycérol, 5 g ; ajusté à pH 4,8. Les souches ont été conservées à -80°C en MRS additionné de glycérol (30 % v/v). Le caractère homofermentaire et hétérofermentaire des souches isolées a été étudié dans un milieu ne contenant que du glucose comme source de carbone. L'éthanol et l'acide DL-lactique ont été dosés par méthode enzymatique (Boehringer, Mannheim, Allemagne). Le reste de l'identification met en œuvre des sondes d'ADN génomique dont la spécificité a été établie en utilisant le protocole suivant. L'ADN génomique de toutes les bactéries lactiques a été isolé par la méthode de Gasson et Davies [8] modifiée par Lonvaud-Funel et al. [11]. Les ADN génomiques des souches de références *Lb. collinoides* ATCC 27612, *Lactobacillus hilgardii* ATCC 8290 et *Lactobacillus yamanashiensis* ATCC 27304 ont été marqués [12] et utilisés comme sondes. L'identification des souches isolées a été réalisée par la méthode d'hybridation en taches, 50 ng d'ADN génomique total ont été déposés sur membrane de nylon chargé positivement (Hybond N+, Amersham, Les Ulis, France). Les dépôts ont été fixés avec une solution de NaOH $0,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant 20 min à température ambiante puis lavés avec une solution de $5 \times \text{SSC}$ avant d'être placés en hybridation à 65°C . Parmi la collection isolée des cidres, les souches appartiennent aux espèces *Lb. collinoides* (35 souches) *Lb. hilgardii* (3 souches), et *Lb. yamanashiensis* (*Lb. mali*) (1 souche).

2.2. Métabolisme du glycérol

Les souches isolées des cidres altérés ont été testées pour leur capacité à dégrader le glycérol en conditions d'anaérobiose dans le milieu MFG. Le 3-HPA, détecté sous forme d'acroléine après distillation, a été dosé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec un détecteur à ionisation de flamme.

Le 4-méthyl pentan-2-ol a été utilisé comme étalon interne. Le 1,3-propanediol a été dosé par CPG avec un détecteur à ionisation de flamme en mode sélection des ions. Les ions caractéristiques $M/Z = 31, 42, 58$ ont été utilisés pour la quantification du 1,3-propanediol et les ions $M/Z = 31, 42, 71$ pour le butanediol 1,4 utilisé comme étalon interne. Le 1,3-propanediol et l'acide 3-hydroxypropionique ont été dosés, après silylation, en CPG avec un détecteur à ionisation de flamme le pentaéarithritol était l'étalon interne. Pour mettre en évidence l'activité glycérol déshydratase, la méthode au MBTH [23] a été pratiquée. Elle est basée sur la capacité des aldéhydes à réagir avec le MBTH pour former un complexe, détecté en spectrophotométrie à 310 nm. Les mesures ont été réalisées sur cellules perméabilisées avec du toluène à 2 % (v/v).

Parmi les 39 souches isolées de cidres altérés, 5 *Lb. collinoides*, 1 *Lb. hilgardii* et la souche *Lb. yamanashiensis* (*Lb. mali*) ne dégradent pas le glycérol pendant la culture tout comme la souche *Lb. collinoides* ATCC 27612 ; en outre pour ces souches aucune activité enzymatique n'est détectée. Les 32 autres souches isolées (30 *Lb. collinoides* et 2 *Lb. hilgardii*) dégradent le glycérol en quantité variable de 39 % à 100 %. Dans

toutes ces souches une activité glycérol déshydratase est mise en évidence. La production d'acroléine et de 1,3-propanediol a été vérifiée pour plusieurs souches de l'espèce *Lb. collinoides*. Pour ces 2 composés, les rendements obtenus sont respectivement de $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $0,8 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de glycérol consommé (Tab. I).

3. FABRICATION DE LA SONDE « GLYCÉROL DÉSHYDRATASE »

Les séquences protéiques de la sous-unité d'environ $60 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ de la glycérol déshydratase de *Cit. freundii*, *Kl. pneumoniae*, *Kl. oxytoca*, *Sl. typhimurium* et *Cl. pasteurianum* ont été alignées pour rechercher des domaines conservés. Un couple d'amorces, GD1 et GD2, a permis par PCR l'amplification d'un fragment de 279 pb (GD) à partir de l'ADN génomique de *Lb. collinoides* IOEB 9527 utilisé comme matrice. L'amplifiat a été purifié par électroéluion [9] et séquencé par la méthode de Sanger (Génopole, Evry, France). L'analyse de la séquence ainsi obtenue montre de très fortes homologues, tant au niveau nucléique que protéique, avec les glycérol déshydratases contenues dans les banques de données. La

Tableau I. Rendements des produits, formés lors de la dégradation du glycérol par la voie d'oxydation et de réduction, pour différentes espèces de bactéries lactiques isolées de cidres ou de vins. Les résultats sont exprimés en moles de produits formés par moles de glycérol consommées. Les concentrations pour [lactate + éthanol + acétate] ont été calculées après déduction des quantités formées à partir du fructose.

Table I. Yield of product, from oxydative and reductive pathway of glycerol degradation, for different species of lactic acid bacteria isolated from ciders or wines. Results are expressed as mole of product for one mole of glycerol degraded. The amounts for [lactate + ethanol + acetate] were calculated by subtracting fructose part.

Espèces (origines)	Acroléine $\text{mmol}\cdot\text{mol}^{-1}$	1,3-propanediol	Acide 3-hydroxy- propionique	[Lactate + éthanol + acétate]
				$\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$
<i>Lb. collinoides</i> (cidre)	$2,5 \pm 1,5$	$0,8 \pm 0,1$	0	0
<i>Lb. hilgardii</i> (vin)	$0,65 \pm 0,35$	$0,63 \pm 0,05$	$0,065 \pm 0,035$	$0,26 \pm 0,05$
Inconnue (vin)	2 ± 1	$0,47 \pm 0,07$	$0,49 \pm 0,03$	0

séquence nucléique est identique à plus de 60 %. Pour la séquence protéique 70 % des acides aminés sont identiques et 83 % ont une fonction identique ou similaire à ceux des séquences des autres espèces (résultats soumis pour publication).

Cet amplifiat marqué constituera la sonde spécifique pour la détection du gène de la glycérol déshydratase.

4. DÉTECTION DES BACTÉRIES LACTIQUES DU CIDRE PAR HYBRIDATION ET PAR PCR

L'amplifiat de 279 pb (GD) obtenu chez *Lb. collinoides* IOEB 9527 a été marqué et utilisé comme sonde dans des hybridations en taches sur les ADN génomiques des 39 souches isolées de cidres et la souche *Lb. collinoides* ATCC 27612. Les hybridations avec la sonde GD révélèrent uniquement les souches qui dégradent le glycérol, celles qui ne le dégradent pas, n'hybridaient pas. Par ailleurs des réactions de PCR ont également été réalisées sur les ADN de ces mêmes souches avec les amorces GD1 et GD2. Le fragment GD était amplifié seulement pour les souches positives et ne l'était

pas pour les souches négatives (Fig. 1). En outre, tous les fragments amplifiés pouvaient hybrider avec la sonde GD en Southern blot.

5. UTILISATION DE LA SONDE GD ET DES AMORCES GD1 ET GD2 POUR L'ENOLOGIE

La biomasse de 2 échantillons de vins, où la présence d'acroléine avait été détectée, a été transférée dans le milieu MFG et incubée 10 j en conditions d'anaérobiose. Durant la culture tout le glycérol avait été dégradé. Des boîtes d'isolement ont été réalisées par étalement des échantillons de culture sur milieu MRS gélosé. Les colonies transférées sur membranes de nylon (Hybond N+, Amersham, Les Ulis, France) ont été traitées sur la membrane puis hybridées avec le fragment GD marqué à la digoxygénine (Boehringer, Mannheim, Allemagne). Parmi les colonies présentes, 20 clones révélés par cette sonde ont été isolés. Chacun d'eux a été remis en culture pour distinguer les souches représentées. Les profils de restriction *Not* I de l'ADN génomique de ces clones ont été analysés par électrophorèse en champ pulsé (temps de pulse 1 à 25 s, 20 h, angle 120°,

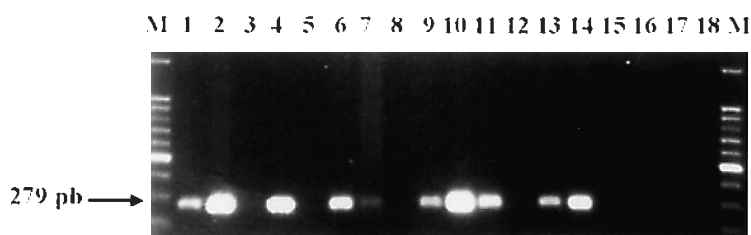


Figure 1. Réactions de PCR avec les amorces GD1 et GD2 sur l'ADN génomique des souches isolées de cidres qui dégradent (+) et qui ne dégradent pas (-) le glycérol. Lignes M, 100 bp ladder (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 pb). Lignes 1, 2, *Lb. hilgardii* (+). Ligne 3, *Lb. collinoides* ATCC 27612 (-). Lignes 4, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, *Lb. collinoides* (+). Ligne 5, *Lb. hilgardii* (-). Lignes 8, 12, 15, 16, 17, *Lb. collinoides* (-). Ligne 18, *Lb. mali* (-).

Figure 1. PCR reactions with GD1 and GD2 primers on genomic DNA of glycerol-degrading (+) and glycerol-undegrading (-) strains isolated from ciders. Lanes M, 100 bp ladder (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp). Lanes 1, 2, *Lb. hilgardii* (+). Lane 3, *Lb. collinoides* ATCC 27612 (-). Lanes 4, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, *Lb. collinoides* (+). Lane 5, *Lb. hilgardii* (-). Lanes 8, 12, 15, 16, 17, *Lb. collinoides* (-). Lane 18, *Lb. mali* (-).

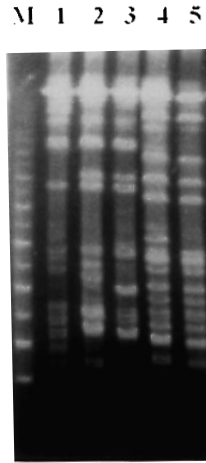


Figure 2. Profil en électrophorèse en champ pulsé après restriction par *Not* I de l'ADN génomique des 5 souches isolées de vins. Ligne M, MidRange II PFG Markers (Biolabs). Lignes 1 à 3, *Lb. hilgardii*. Lignes 4, 5, lactobacilles non identifiés.

Figure 2. Pulse field gel electrophoresis of *Not* I restricted genomic DNA of the 5 strains isolated from wines. Lane M, MidRange II PFG Markers (Biolabs). Lanes 1 to 3, *Lb. hilgardii*. Lanes 4, 5, unidentified *Lactobacillus* species.

6 V·cm⁻¹). Ces 20 clones appartiennent en fait à 5 souches différentes par leur carte génomique (Fig. 2). Elles ont été identifiées par la technique d'hybridation en taches et/ou par séquençage de l'ADNr 16S. L'ADN génomique de référence *Lb. hilgardii* ATCC 8290 et la sonde spécifique « 1.REP » de l'espèce *Lb. hilgardii* [21] ont été utilisés comme sondes pour rechercher cette espèce. Pour les autres, l'identification a été tentée avec les sondes d'ADN génomique spécifiques de tous les lactobacilles contenus dans la collection IOEB. Parmi les 5 souches isolées des vins, 3 appartiennent à l'espèce *Lb. hilgardii*. Pour les autres souches (4 et 5, Fig. 2), l'espèce reste à déterminer.

Sur ces 5 souches qui dégradent le glycérol et révélées par hybridation sur colonies avec la sonde GD mise au point chez *Lb. collinoides* IOEB 9527, les amorces GD1 et GD2 ont été utilisées dans des réactions de PCR. Un fragment unique de 279 pb est amplifié pour les 3 souches de *Lb. hilgardii* et 2 fragments, dont un à 279 pb, pour les souches d'espèce inconnue (Fig. 3). Les

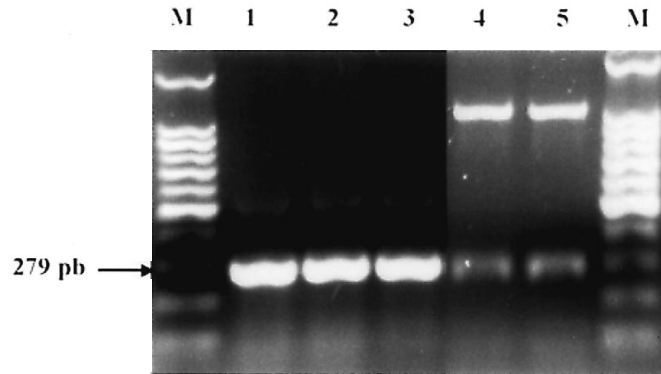


Figure 3. Réactions de PCR avec les amorces GD1 et GD2 sur l'ADN génomique des souches isolées de vins qui dégradent le glycérol. Lignes M, 100 bp ladder (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 pb). Lignes 1 à 3, *Lb. hilgardii*. Lignes 4, 5, Lactobacilles non identifiés.

Figure 3. PCR reactions with GD1 and GD2 primers on genomic DNA of glycerol-degrading strains isolated from wines. Lanes M, 100 bp ladder (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp). Lanes 1 to 3, *Lb. hilgardii*. Lanes 4, 5, unidentified *Lactobacillus* species.

amplifiés à 279 pb des 5 souches hybrident avec la sonde GD en Southern blot, l'amplifié plus long des souches 4 et 5 n'hybride pas.

En culture, ces 5 souches isolées de vins altérés, utilisent totalement le glycérol. La formation d'acroléine, de 1,3-propanediol et d'acide 3-hydroxypropionique a été vérifiée. Les souches de *Lb. hilgardii* produisent beaucoup moins d'acroléine que *Lb. collinoides* et les 2 souches d'espèce inconnue. Ces dernières peuvent produire autant de 1,3-propanediol que d'acide 3-hydroxypropionique. Par ailleurs, la « voie d'oxydation » utilisant la glycérol déshydrogénase fonctionne chez *Lb. hilgardii* ; 26 % du glycérol sont en moyenne transformés en (lactate + éthanol + acétate). Pour les 3 espèces de bactéries lactiques considérées, celles isolées des cidres et celles isolées des vins, la proportion de 1,3-propanediol formée par molécule de glycérol consommée varie de façon importante (Tab. I).

6. DISCUSSION

Dans les cidres altérés étudiés, l'espèce dominante de bactéries lactiques était *Lb. collinoides* et une forte proportion des souches isolées dégradent le glycérol en anaérobiose par la voie de la glycérol déshydrogénase. Cependant, *Lb. hilgardii* est également impliqué dans l'altération et notamment dans les vins. Par ailleurs, cette étude nous a conduit à isoler des vins une espèce de lactobacille productrice de 3-HPA jusqu'ici jamais identifiée.

La capacité à dégrader le glycérol ne semble donc pas caractériser une espèce. Ainsi au sein d'une espèce, notamment pour *Lb. collinoides*, existent des souches positives et négatives pour ce caractère. En condition d'anaérobiose, le glycérol est essentiellement transformé en 1,3-propanediol par la glycérol déshydrogénase et la 1,3-propanediol déshydrogénase. L'acroléine provenant du 3-HPA intermédiaire est

produite en très faible quantité. Ceci suppose une forte activité 1,3-propanediol déshydrogénase et la présence de NADH, H⁺ en concentration non limitante ; de cette façon les souches positives éliminent le 3-HPA par réduction en alcool correspondant. Ce processus de transformation est nécessaire à la croissance et à la survie des bactéries car le 3-HPA est un puissant inhibiteur de croissance [2] et la réoxydation du coenzyme est aussi indispensable. Certaines des souches étudiées ne dégradent le glycérol qu'à 39 %. On suppose dans ce cas que l'activité glycérol déshydrogénase peut être l'étape limitante, comme ceci a été montré pour *Cl. butyricum* [1]. La disponibilité du coenzyme réduit pourrait aussi être en cause. Elle dépend de la balance redox de la cellule, donc de l'ensemble de son métabolisme et des conditions de milieu. Par ailleurs l'acroléine et le 1,3-propanediol ne sont pas toujours produits dans les mêmes proportions. Une mole de glycérol est transformée de 40 % à 90 % en 1,3-propanediol selon l'espèce considérée. La production d'acide 3-hydroxypropionique par oxydation de 3-hydroxypropionaldéhyde ainsi que l'existence de la voie de la glycérol déshydrogénase chez certaines espèces peuvent expliquer ces résultats. L'hypothèse de l'existence du régulon *dha* complet, codant pour les 2 voies métaboliques (voie oxydative et voie réductrice) du glycérol est tout à fait plausible et doit être étudiée.

De ce régulon, ou d'une partie de ce régulon, une région du gène *dhaB* a été séquencée après amplification. Le pourcentage d'identité entre ce fragment GD de *Lb. collinoides* et les autres séquences correspondantes chez les autres micro-organismes est très élevé comparé aux distances phylogénétiques entre bactéries à Gram positif et Gram négatif. Il en est de même des homologues des séquences d'acides aminés déduites qui atteignent 83 %. La région de la glycérol déshydrogénase séquencée pour *Lb. collinoides* apparaît très conservée tout comme pour les autres espèces, expliquant la fiabilité de la sonde et des amorces

utilisées pour la détection. Les souches de *Lb. collinoides* négatives n'amplifient pas le fragment GD et leurs ADN n'hybrident pas avec la sonde GD. Ces résultats suggèrent qu'elles ne possèdent pas le gène de la glycérol déshydratase. Ce gène pourrait avoir été transféré seulement à quelques souches de *Lb. collinoides* ou bien seule une partie de la population l'aurait conservée. De même les souches de *Lb. hilgardii* positives ainsi que d'autres d'une espèce non identifiée amplifient le même fragment et hybrident avec la sonde GD.

Finalement les amorces GD1 et GD2 permettent l'amplification d'un fragment spécifique chez différentes espèces, correspondant à 279 pb de la séquence des gènes des glycérol déshydratases. Par conséquent, ces amorces sont de bons outils pour détecter la présence du gène de la glycérol déshydratase chez les bactéries lactiques comme *Lb. collinoides* ou *Lb. hilgardii* présent dans les boissons fermentées et d'autres aliments. Elles peuvent être utilisées pour l'amplification directe sur cellules. La sonde GD est également fiable, elle peut être utilisée en hybridation sur colonies afin d'évaluer au sein d'une population la proportion de bactéries indésirables pendant la fabrication du cidre, du vin ou d'autres boissons fermentées.

REMERCIEMENTS

Nous remercions L'ADRIA-Normandie (Association pour le Développement de la Recherche Appliquée dans les Industries Agricoles et Alimentaires de Normandie) pour avoir financé en partie ce projet.

RÉFÉRENCES

- [1] Abbad-Andaloussi S., Guedon E., Spiesser E., Pettitdemange H., Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1,3 propanediol production by *Clostridium butyricum*, Lett. Appl. Microbiol. 22 (1996) 311–314.
- [2] Axelsson L.T., Chung T.C., Dobrogosz W.J., Lindgren S.E., Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*, Microb. Ecol. Health Dis. 2 (1989) 131–136.
- [3] Barbirato F., Bories A., Camarasa-Claret C., Grivet J.P., Glycerol fermentation by a new 1,3 propanediol producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 43 (1995) 786–793.
- [4] Bobik T.A., Xu Y., Jeter R.M., Otto K.E., Roth J.R., Propanediol utilization genes (pdu) of *Salmonella typhimurium*: three genes for the propanediol dehydratase, J. Bacteriol. 179 (1997) 6633–6639.
- [5] Daniel R., Gottschalk G., Growth temperature-dependent activity of glycerol dehydratase in *Escherichia coli* expressing the *Citrobacter freundii dha* regulon, FEMS Microbiol. Lett. 100 (1992) 281–286.
- [6] Daniel R., Bobik T.A., Gottschalk G., Biochemistry of coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of encoding genes, FEMS Microbiol. Rev. 22 (1999) 553–566.
- [7] de Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E., A medium for the cultivation of *Lactobacilli*, J. Appl. Bacteriol. 23 (1960) 130–135.
- [8] Gasson M.J., Davies F.L., Conjugal transfer of drug resistance plasmid pAM β 1 in lactic streptococci, FEMS Microbiol. Lett. 7 (1980) 51–53.
- [9] Graham F., A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels, Anal. Biochem. 106 (1980) 492.
- [10] Heyndrickx M., de Vos P., Vacanneyt M., de Ley J., The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212t2 and 1213t1 and *Clostridium pasteurianum* LMG 3285, Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 (1991) 637–642.
- [11] Lonvaud-Funel A., Fremaux C., Biteau N., Joyeux A., Speciation of lactic acid bacteria from wines by hybridization with DNA probes, Food Microbiol. 8 (1991) 215–222.
- [12] Lonvaud-Funel A., Joyeux A., Ledoux O., Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non isotopic DNA probes, J. Appl. Bacteriol. 71 (1991) 501–508.
- [13] Macis L., Daniel R., Gottschalk G., Properties and sequence of the coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium pasteurianum*, FEMS Microbiol. Lett. 164 (1998) 21–28.
- [14] Pasteur L., Études sur le vin, Imprimerie Impériale, Paris, France, 1866.
- [15] Rentschler H., Tanner H., Das bitterwerden der Rotweine, Mitt. Gebeite Lebensmittelunsters. 42 (1951) 463–475.
- [16] Schutz H., Radler F., Anaerobic reduction of glycerol to propanediol 1,3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*, Syst. Appl. Microbiol. 5 (1984) 169–178.

- [17] Seyfried M., Daniel R., Gottschalk G., Cloning, sequencing and overexpression of the genes encoding coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 5793–5796.
- [18] Skraly F.A., Lytle B.L., Cameron D.C., Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 98–105.
- [19] Smiley K.L., Sobolov M., A cobamide requiring glycerol dehydrase from an acrolein-forming *Lactobacillus*, *Arch. Biochem. Biophys.* 97 (1962) 538–543.
- [20] Sobolov M., Smiley K.L., Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *Lactobacillus*, *J. Bacteriol.* 79 (1959) 261–266.
- [21] Sohier D., Coulon J., Lonvaud-Funel A., Molecular identification of *Lactobacillus hilgardii* and genetic relatedness with *Lactobacillus brevis*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (1999) 1075–1081.
- [22] Talarico T.L., Dobrogosz W.J., Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 1195–1197.
- [23] Toraya T., Ushio K., Fukui S., Hogenkamps H.P.C., Studies on the mechanism of adenosylcobalamin dependent dioldehydratase reaction by the use of analogs of the coenzyme, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 963–970.
- [24] Toraya T., Kuno S., Fukui S., Distribution of coenzyme B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of Enterobacteriaceae and Propionibacteriaceae, *J. Bacteriol.* 141 (1980) 1439–1442.

