

Origine et importance de l'activité amylasique dans la fermentation lactique des racines de manioc

*Origin and importance of amylase activity in cassava roots
during lactic acid fermentation*

S. KÉLÉKE, L. KIMPOLO-KIMFOKO, A. BRAUMAN

*Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie ORSTOM,
Brazzaville (Congo)*

- Résumé -

L'objectif de ce travail est d'établir l'importance et l'origine de l'activité amylasique au cours de la fermentation des racines de manioc effectuée en Afrique centrale. Dans ce but, l'activité et la microflore amylolytique ont été suivies au cours de deux fermentations, l'une effectuée en condition standard, l'autre effectuée en condition stérile. L'activité amylasique est présente dans la racine fraîche, demeure constante dans le rouissage stérile mais disparaît après 36 h dans le rouissage standard. La baisse de cette activité semble être corrélée avec l'acidification des racines de manioc. La microflore amylolytique est une microflore épiphyte dont la densité augmente dans les premières 24 h de la fermentation pour se stabiliser (10^8 bact./g de P.F.) après 48 h de fermentation. L'évolution de l'activité amylasique n'est donc pas liée à celle de la microflore amylolytique ce qui démontre l'origine strictement végétale de l'activité amylasique mesurée. Les bactéries amylolytiques présentes semblent utiliser préférentiellement les sucres plus facilement fermentescibles présents dans la racines. Les principales bactéries amylolytiques isolées appartiennent au genre *Klebsellia sp.* et *Bacillus (bacillus polymixa)*. La microflore lactique amylolytique est beaucoup moins importante, (~ 0,2 % de la microflore amylolytique total après 48 h de rouissage) et diminue progressivement au cours du rouissage. Il s'agit principalement de l'espèce homolactique *Lactobacillus plantarum*, caractéristique des fermentations végétales. Cette étude démontre ainsi la présence d'une activité amylase dans le processus du rouissage, d'origine strictement végétal, mais d'impact négligeable dans la fermentation lactique des racines de manioc.

- Abstract -

The objective of this study was to establish the importance and origin of amylase activity during the fermentation of cassava roots as carried out in Central Africa. With this objective, the Amylolytic microflora and their activities were followed during two fermentations, one performed under traditional conditions and a control performed under sterile conditions.

Amylase activity in fresh roots remained constant in the control fermentation but disappeared after 36 h in the traditional retting. the decline in activity appears to be correlated to cassava root acidification. Amylolytic microflora consist of plant epiphyte bacteria whose numbers increased during the first 24 h of fermentation and remained constant (10^8 bacteria g⁻¹ fresh weight) after 48 h.

The variation in amylase activity is therefore not linked to that of amylolytic microflora which shows the strict plant origin of the estimated amylase activity. Amylolytic bacteria present during fermentation appears to use preferentially the fermentable sugars founds in cassava roots. The principal amylolytic bacteria isolated belong to the genera *Klebsellia sp.* and *Bacillus sp* (*Bacillus polymixa*). The lactic amylolytic microflora was less important (~ 0,2 % of the total amylolytic microflora after 48 h of retting) and decreased progressively during retting. It is mostly the homolactic acid species, *Lactobacillus plantarum* characteristic of plant fermentations.

This study shows the presence of an amylase activity during retting strictly of plant origin but of negligible effect on lactic acid fermentation of cassava roots.

Introduction

Le manioc est un aliment essentiellement énergétique, il peut contenir jusqu'à 86 % d'amidon (Giraud, 1993). La fermentation lactique des racines de manioc permet ; leurs préservations (Okafor *et al.*, 1984), leurs ramollissements (Ampe *et al.*, 1995) et la production d'acides organiques et d'alcools, importants pour les propriétés organoleptiques du produit final (Okafor *et al.*, 1984 ; Ampe *et al.*, 1994). Les études entreprises sur la caractérisation de cette microflore ont démontré l'existence de micro-organismes amylolytiques (Cardenas *et al.*, 1980 ; Amund and Ogunsu, 1987 ; Regez *et al.*, 1989 ; Giraud *et al.*, 1991). Pourtant les grains d'amidon ne semblent pas être attaqués au cours du processus et la perte en matière sèche des racines de manioc reste faible (Brauman *et al.*, 1992). Le présent travail a donc été réalisé afin de déterminer l'origine et la réelle importance de l'amyolyse dans le processus de rouissage des racines de manioc.

Matériel et Méthodes

1. Origine des racines de manioc

Les racines de manioc (*Manihot esculenta* Crantz, var. F 100) utilisées proviennent de la station expérimentale Agricongo. Elles sont récoltées 12 à 15 mois après plantation.

2. Protocole de rouissage

2.1. Rouissage standard [RSt]

Après prélèvement aux champs, les racines de manioc, non altérées, sont lavées, épluchées puis sectionnées en pièces de 4 cm de long et 10 cm de diamètre. Elles sont ensuite immergées dans de l'eau de puits dans un ballon en verre de 10 l bouché avec du coton cardé.

2.2. Rouissage stérile [RS]

Les racines de manioc saines préalablement préparées selon la procédure décrite ci-dessus puis stérilisées pendant 15 mn avec une solution de chlorure de mercure à 0,1 % dans l'éthanol à 70 % (Okafor *et al.*, 1984). Elles sont ensuite rincées et immergées dans de l'eau stérile. Les prélèvements sont effectués sous une hotte à flux laminaire.

3. Analyses physico-chimiques

3.1. Indices de pénétration

Le protocole utilisé pour suivre le ramolissement des racines est celui décrit dans (Ampe *et al.*, 1994).

3.2. pH des racines de manioc au cours du rouissage

Le protocole utilisé pour suivre le pH des racines de manioc est celui décrit dans (Ampe *et al.*, 1994).

4. Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques sont réalisées sur les échantillons de manioc prélevés toutes les 12 heures pendant le rouissage.

60 g. de racines de manioc sont homogénéisés dans un broyeur (Warring Blender) en présence de 540 ml d'eau peptonée stérile.

Des dilutions croissantes sont réalisées pour ensemercer différents milieux de culture.

5. Milieu pour numération

5.1. Des bactéries amylolytiques totales (BAT)

Composition en g/l : peptone 5 ; extrait de levure 3 ; agar 15 ; amidon soluble 20.

Eau distillée 1 000 ml Q.S.P., pH ajusté à 6,9.

Le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 mn puis réparti en boîtes de Pétri.

Les cultures sont incubées à 30 °C. La révélation des bactéries amylolytiques se fait par visualisation des plages de lyse après exposition des boîtes de Pétri à des vapeurs d'iode.

Les colonies sont ensuite isolées sur le même milieu et caractérisées à l'aide de critères morphologiques (Gram, observation microscopique) et biochimiques (catalase, oxydase, profils fermentaires à l'aide des galeries API 20, 20 A, 20 E STERP ; Biomerieux France)

5.2. Des bactéries lactiques amylolytiques (BAL)

Le milieu est du MRS (MRS broth, Detroit, Mi, USA) reconstitué avec de l'amidon soluble (Sigma) qui remplace le glucose.

Composition en g/l : peptone 10 ; extrait de viande 5 ; extrait de levure 5 ; amidon soluble 20 ; di-potassium hydrogénéphosphate 2 ; tween 80 1 ; di-ammonium hydrogéné-citrate 2 ; sodium acétate 5 ; magnésium sulfate 0,1 ; manganèse sulfate 0,05 ; agar 12

Eau distillée 1 000 ml ; pH ajusté à 6,5.

Le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 mn, avant la répartition en boîtes de Pétri, 2 ml d'une solution stérile de bleu d'aniline (25 g/l.) sont ajoutés.

La révélation des bactéries amylolytiques se fait par visualisation des bactéries colorées par le bleu d'aniline et présentant des plages de lyse, après exposition des boîtes de Pétri à des vapeurs d'iode.

6. Analyse biochimique

6.1. Dosage de l'activité amylase

L'activité amyliasique a été estimée par la vitesse d'hydrolyse de l'amidon. Cette activité est mesurée par ajout de 0,1 ml d'extrait enzymatique (extrait de manioc) à 0,8 ml d'une solution contenant 1 % d'amidon soluble (Sigma) dans un tampon citrate phosphate 0,1 M, pH 6,9. La réaction est stoppée par addition de 0,1 ml d'acide sulfurique 2 N.

L'amidon résiduel est dosé à différents temps d'incubation à 30 °C suivant la méthode de Oteng-Gyang (1979), basée sur la propriété de l'amidon soluble à former en présence de réactif iodo ioduré, un complexe brun absorbant à 620 nm. Cette méthode permet de doser des concentrations en amidon allant jusqu'à 10 g/l.

Le réactif iodo ioduré est préparé par dilution à 4 % de la solution suivante : KI 30 g/l ; I₂ 3 g/l.

La réaction colorée est obtenue en ajoutant 0,1 ml de l'échantillon convenablement dilué à 2,4 ml de réactif iodo ioduré. La densité optique est lue à 620 nm. Une gamme étalon d'amidon soluble allant de 0 à 10 g/l est réalisée en parallèle pour chaque série de mesures.

Une unité enzymatique (UE) est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire à l'hydrolyse de 10 mg d'amidon en 30 minutes à 30 °C.

6.2. Dosage des sucres et des métabolites

Dosage effectué en chromatographie liquide haute performance (HPLC) selon le protocole décrit par Brauman (Brauman *et al.*, 1995)

Résultats

1. Rouissage des racines de manioc

On ne constate aucun ramollissement des racines ni production d'acides organiques au cours du rouissage stérile (RS). Ceci confirme nos précédents résultats (Ampe *et al.*, 1994) sur l'origine bactérienne du ramollissement des racines au cours du rouissage.

2. Évolution de l'activité amylasique (figure 1)

L'activité amylasique a été mesurée au cours des deux rouissages ; stérile et standard (RSt). Cependant, cette activité déjà présente dans les racines fraîches demeure constante au cours du RS alors qu'elle diminue à partir de 12 heures et disparaît après 36 heures dans le RSt.

Les profils d'élutions obtenues sur chromatographie liquide montrent que l'amidon soluble en présence d'extraits enzymatiques provenant du jus de rouissage est dégradée essentiellement en maltose et glucose.

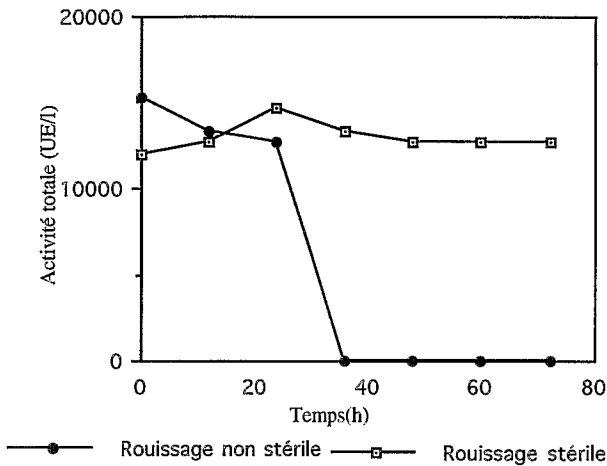


Figure 1
évolution de l'activité amylasique en cours

3. Évolution du pH et de la matière sèche

L'évolution du pH au cours des deux rouissages (figure 2) montre une différence importante entre les deux rouissages. Au cours du RSt, le pH se stabilise autour de 6 après 10 h de fermentation, alors qu'il atteint des valeurs beaucoup plus acides (pH = 4) au cours du RS. Le pH des racines de manioc est plus élevé d'environ une unité, dû à l'effet tampon des racines. Dans le RSt, l'évolution du pH racinaire est très similaire à celui de l'activité amylasique (figure 3) ce qui révèle une étroite corrélation entre l'acidification du milieu et la disparition de l'activité amylase.

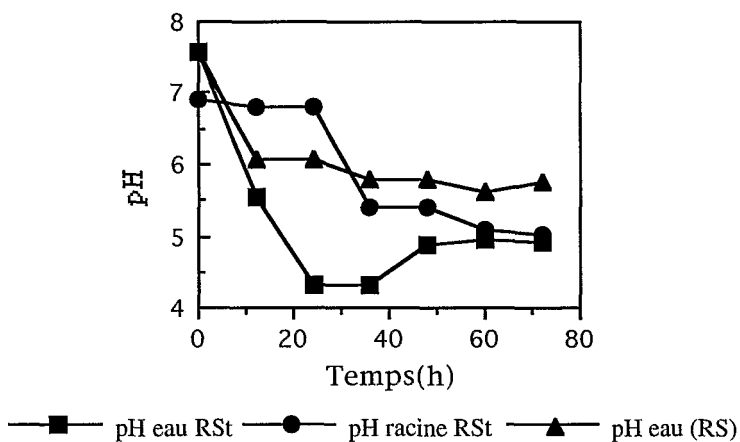


Figure 2
évolution du pH au cours du rouissage

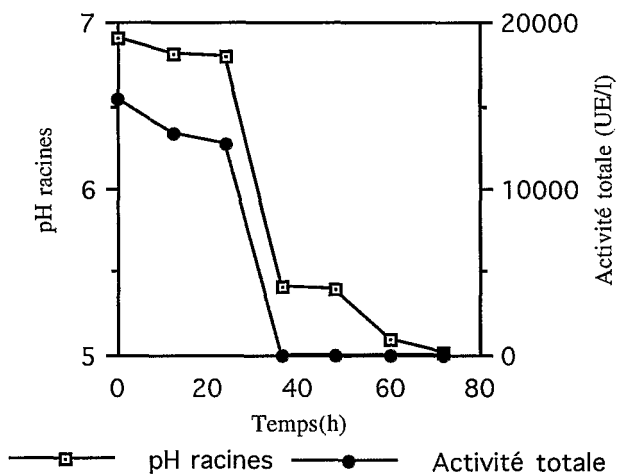


Figure 3
évolution de l'activité amylasique et du pH au cours du rouissage standard

Au cours du processus de rouissage standard, et malgré le ramollissement important des racines, la perte de matière sèche reste très faible (~ 15 % cf. figure 4).

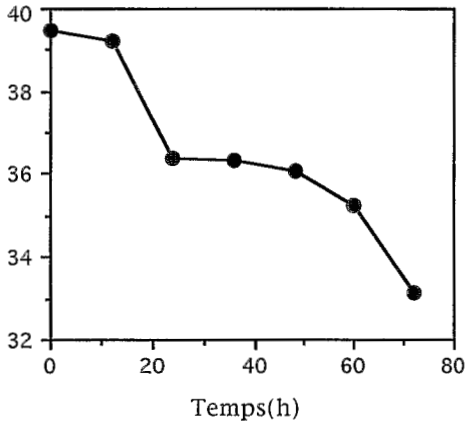


Figure 4
Évolution de la matière sèche au cours du rouissage traditionnel

4. Numération de la flore amylytique (figure 5)

Il existe une flore amylytique (BAT) sur le tubercule frais, celle-ci augmente et se stabilise après 36 h du rouissage vers $8 \cdot 10^7$ bact./g PF. Cette microflore est composée principalement de *Bacillus*, dont *Bacillus polymixa* constitue l'espèce la plus représentative et d'*Enterobacteriaceae* dont notamment le genre *Klebsellia sp.*

La densité de la flore lactique amylytique (BAL) est beaucoup moins importante (figure 6) que celle des BAT, elle atteint son maximum après 24 h de rouissage ($18 \cdot 10^4$ ufc/g) et diminue jusqu'à presque disparaître après 72 h. Les BAL constituent la majorité de la flore lactique épiphyte du tubercule (figure 6) composée en majorité de *Lactococcus lactis* et de *Leuconostoc mesenteroides* qui vont devenir la flore lactique majoritaire du processus. A partir du premier jour de fermentation, la densité des BAL diminue constamment, dès le deuxième jour de fermentation, elle représente moins de 0,1 % de la flore lactique. La majorité des BAL sont composés de Lactobacilles, dont l'espèce *L. plantarum* semble la plus représentative.

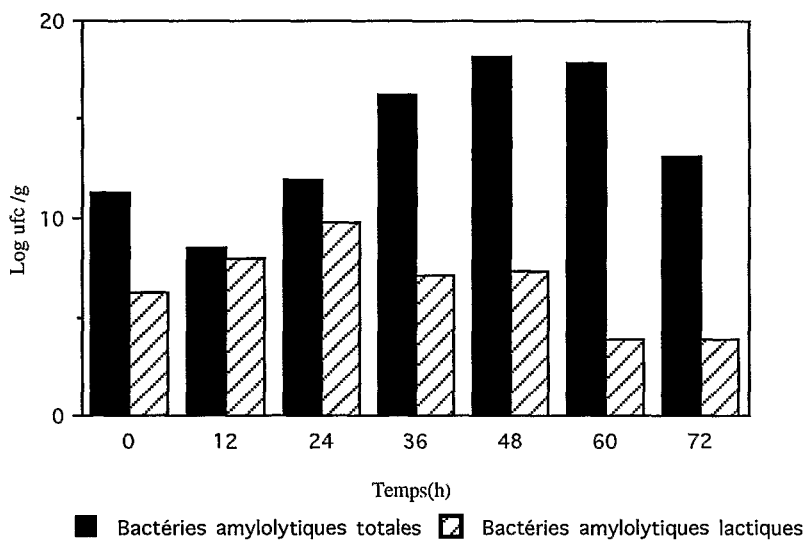


Figure 5
évolution des bactéries amylolytiques au cours du rouissage

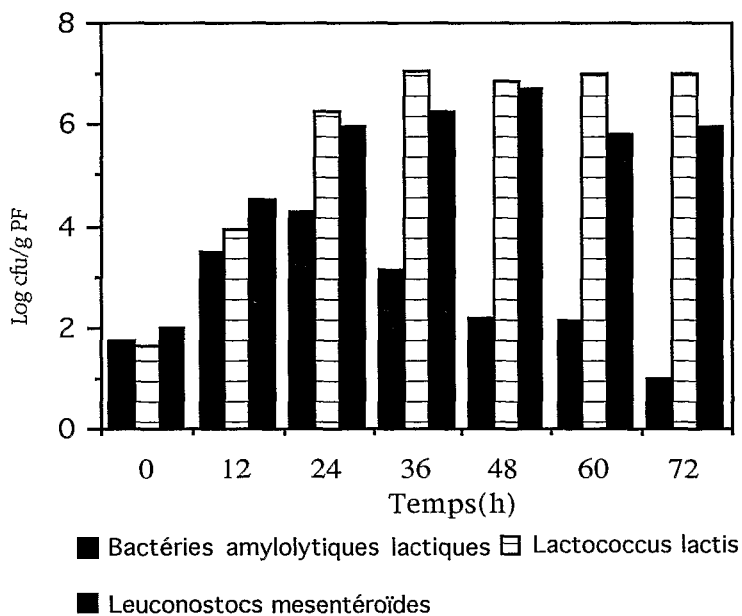


Figure 6
évolution de la microflore lactique au cours du rouissage

Discussion et Conclusion

La présence d'une activité amylasique au cours du rouissage a été déjà mentionnée par Oyewole (1992). Cet auteur attribue cette activité aux bactéries amylolytiques aérobies dont la disparition dans les premières heures du procédé expliquerait la baisse brutale de l'activité amylasique au cours du rouissage. Dans notre étude, l'évolution de la microflore amylolytique atteint sa densité maximum au moment où l'activité amylasique disparaît. Il n'y a donc aucune corrélation entre l'activité amylasique mesurée et la flore amylolytique dénombrée. De plus, la présence d'une activité amylasique dans les racines de manioc fraîches après récoltes et le maintien de cette activité au cours du rouissage stérile démontre l'origine végétale et non bactérienne de l'enzyme. Bien qu'il s'agisse, à notre connaissance de la première mention de la présence d'une amylase dans les racines de manioc, ce résultat n'est pas surprenant car les amylases sont des enzymes très souvent rencontrées dans le règne végétal et notamment dans les plantes à tubercules ou elles assurent un rôle dans la maturation et la germination (Mercier, 1985).

La disparition de cette activité dans le rouissage standard pourrait être attribuée à la dénaturation de l'enzyme suite à l'acidification du milieu par les bactéries lactiques (cf. figure 3). Cependant cette disparition peut avoir d'autres origines comme la production de protéases par les bactéries lactiques (Gripon, 1985) ou la production de métabolites inhibiteurs par la flore fermentaire (Giraud, communication personnelle). La faible activité de cet enzyme et sa disparition rapide au cours du processus explique qu'elle ne peut attaquer les grains d'amidon du manioc.

L'évolution quasi contraire de l'activité amylasique et de la flore amylolytique peut sembler paradoxale. De plus, de nombreux auteurs ont mis en évidence la présence des bactéries amylolytiques dans le processus de rouissage des racines de manioc (Collard et Levy, 1959 ; Cardenas et al, 1980 ; Regez et al, 1989 ; Giraud et al, 1991 ; Jaime, 1994). En fait, les bactéries amylolytiques présentes semblent utiliser comme substrat de croissance les sucres endogènes, plus facilement fermentescible, du manioc ; saccharose, fructose et glucose (Brauman et al, 1992). Ce qui fut confirmé par l'étude physiologique des bactéries amylolytiques isolées ; en présence de glucose, aucune dégradation de l'amidon n'a pu être mesurée. De plus leurs aptitudes à utiliser l'amidon soluble ne donne aucune indication sur leurs aptitudes à dégrader l'amidon cru du manioc, très réfractaire à la biodégradation (Mercier, 1985).

La présence de *Bacillus sp.* a été préalablement mentionné dans le processus de production de Gari (Ejiofor et Okafor, 1981) et le jus de rouissage pour la production de fofou (Farine de manioc, Okafor et al., 1984). La présence

de *L. plantarum* amylolytique confirme que cette espèce a forte activité amyliasique est une bactérie importante du processus de rouissage (Giraud et al, 1991) ; par contre, nous n'avons pas identifié comme d'autres auteurs des levures (Okafor et Ejiofor, 1990) ou des *Corynebacterium* amylolytiques. (Collard et Levy, 1959).

En conclusion, une activité amyliasique a été détectée au cours du rouissage, mais celle-ci est de nature endogène aux racines de manioc et disparaît au cours du rouissage. L'amylolyse ne semble donc pas jouer un rôle important dans le processus de rouissage des racines de manioc.

Références

- AMPE (F.), BRAUMAN (A.), TRECHE (S.), AGOSSOU (A.), 1994 - The fermentation of cassava : optimization by the experimental research methodology. *J. Sci. Food. Agric.*, 65 : 355-361.
- AMUND (O.O.), OGUNSA, (O.A.), 1987 - Extracellular amylase production by cassava fermenting bacteria. *Journal of industrial Microbiology*, 2 : 123-127.
- BRAUMAN (A.), TRECHE (S.), LEGROS (O.), *et al.*, 1992 - *Amélioration de la qualité des aliments fermentés à base de manioc. Opération Congo*. Rapport de fin d'études dans le cadre du programme CEE-STD2 (Contrat n° TS2A-O226), 54 p.
- CARDENAS (O.S.), DE BUCKLE (I.S.), 1980 - Sour cassava starch production : A preliminary study, *Journal of Food Science.*, vol 45 : 1509-1512.
- CIAT, 1993 - *Cassava : the latest facts about an ancient crop. A summary of information on 52 major cassava producing and consuming countries in Africa, Asia, Oceania, Latin America, and the Caribbean*. CIAT, October 1993.
- COLLARD (P.), LEVIS (S.), 1959 - A two stage fermentation of cassava. *Nature*, 183 : 620-621.
- EJIOFOR (M.A.N.), OKAFOR (N.), 1981 - « Comparaison de la pulpe de manioc comprimée et non comprimée pour la préparation du gari ». In Terry, (E.R.) *et al.*, éd. : *Tropical Root Crops : Research Strategies for the 1980s* : 163-168.
- GIRAUD (E.), BRAUMAN (A.), KELEKE (S.), LELONG (B.), RAIMBAULT (M.), 1991 - Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 36 : 379-383.

GIRAUD (E.), 1993 - *Contribution à l'étude physiologique et enzymomogique d'une nouvelle souche de lactobacillus plantarum amylolytique isolée du manioc fermentée.* Thèse de biologie cellulaire, Université de Provence Aix-Marseille I, 137 p.

GRIPON (J.C.), 1985 - « Les enzymes protéolytiques des industries laitières ». In Mouranche (A.), Costes (C.), édés., *Hydrolases et dépolymérasés*, collection Biochimie Appliquée dirigée par C. Costes. Gauthier-Villars : 239-278.

JAIME ARANRO (A.L.), 1994 - *Evaluacion de bacterias lacticas amiloliticas aisladas de la fermentacion del amidon de yuca y su efecto en la calidad del amidon agrío.* Mémoire de fin d'étude. Universidad del valle. 66 pages.

MERCIER (C.), 1985 - « Les enzymes amylolytiques ». In Mouranche (A.), Costes (C.), édés., *Hydrolases et dépolymérasés*, collection Biochimie Appliquée dirigée par C. Costes. Gauthier-Villars : 109-142.

OKAFOR (N.), IJIOMA (B.), OYOLU (C.), 1984 - Studies on the microbiology of cassava retting for foo-foo production. *J. Appl. Bacteriol.*, vol 56 : 1-13.

OKAFOR (N.), EJIOR (A.O.), 1990 - Rapid detoxification of cassava mash fermenting for gari production following inoculation with a yeast simultaneously producing linamarase and amylase. *Proc. Biochem. Int.* : 82-86.

OTENG-GYANG (K.), 1979 - *Etude de levures amylolytiques en vue de production de protéines d'organismes unicellulaires.* Thèse de doctorat de 3^e cycle, Université Montpellier II, 120 p.

OYEWOLE (O.B.), ODUNFA (S.A.), 1992 - Extracellular enzyme activities during cassava fermentation for « fufu » production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 8 : 71-72

REGEZ (P.F.), RIGAMONTI (C.), GEIGES (O.), 1989 - Evaluation de l'activité amylolytique et de la formation de biomasse de quelques champignons isolés de la pulpe de manioc et du pain de manioc (chikwangué) au Zaïre. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 1988, vol. 7 : 17-24.