

UNIVERSITE DE PROVENCE
AIX-MARSEILLE I

THESE
présentée par

Eric GIRAUD

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR - MENTION SCIENCES
(Biologie Cellulaire-Microbiologie)

**CONTRIBUTION A L'ETUDE PHYSIOLOGIQUE ET ENZYMOLOGIQUE
D'UNE NOUVELLE SOUCHE DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM*
AMYLOLYTIQUE ISOLEE DU MANIOC FERMENTE**

Soutenue le 1^{er} mars 1993 devant le jury composé de :

Président :	M. J.L. GARCIA
Rapporteurs :	M. C. BOURGEOIS
	M. C. DIVIES
Examineurs :	M. J.P. BELAICH
	M. J.R. PRIGENT
	M. M. RAIMBAULT



21 JUIN 1995

#200074505

2 ex FDI
Non Num

084
FERMEN
GIR

Réalisée au laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM de Montpellier

F 41.698

*A ma tendre compagne Sylvie et mon p'tit bout'chou Éléa,
A mon cher père disparu et ma formidable maman,
mais aussi à toute ma famille si unie et dont je suis si
fier...*

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de biotechnologie du centre ORSTOM de Montpellier, au sein duquel j'ai trouvé un cadre et des moyens de travail très favorables. Je tiens en premier lieu, à remercier la direction de l'ORSTOM pour m'avoir permis de mener à bien mes recherches dans ce laboratoire. Merci aussi à la CEE pour son support financier lors de la réalisation de ces travaux.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à Monsieur Maurice Raimbault, directeur de recherche à l'ORSTOM, pour m'avoir accueilli pendant ces trois années et pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail. Sa grande connaissance des fermentations traditionnelles, ses avis éclairés et son respect des initiatives personnelles ont constitué un appui constant.

Que Monsieur Jean-Louis Garcia, directeur de recherches à l'ORSTOM qui me fait l'honneur de présider ce jury, reçoive ici tous mes sincères remerciements. Je lui dois d'avoir découvert un Institut de Recherche et je lui suis très reconnaissant pour ses corrections apportées à ce manuscrit.

C'est avec plaisir que je remercie Messieurs les professeurs C. Divies et C. M. Bourgeois pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le professeur J. P. Belaïch et Monsieur J. R. Prigent, directeur scientifique à la société Texel, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

A tous les gens qui ont participé de près ou de loin à ce travail de recherche, je tiens à exprimer toute ma gratitude. Une mention spéciale pour Laurent Gosselin qui a participé étroitement à la réalisation de ces travaux dans le cadre de son stage de fin d'étude d'ingénieur, qu'il soit ici remercié pour la bonne entente qu'il a fait régner dans le laboratoire, son dynamisme et le vif intérêt qu'il a porté à ce travail.

Comment oublier l'aide de Bertrand Lelong et Estelle Bresson, dont j'ai pu apprécier la qualité et l'efficacité de leur collaboration technique. Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier Sébastien Roussos pour son appui lors de la réalisation de ce travail. Merci aussi à Bernard Marin pour ses judicieux conseils et son soutien constant.

Toute ma sympathie et ma reconnaissance vont à Alain Brauman et à toute son équipe de Brazzaville pour la fructueuse collaboration qui s'est établie entre nous.

Un grand merci à Sylvain Denis, Nathalie Pujet et Didier Alazard pour leurs nombreuses corrections et leurs judicieuses remarques.

C'est avec un vif plaisir que je remercie Dominique Dufour, Gérardo Saucedo, Maria Tréjo, Isabelle Gaime, Laure Hannibal, Zakia Amalou, Pierre et Marie France Trouslot, Carlos Soccol, pour leur soutien constant, leur amitié et leurs encouragements.

Enfin, je terminerai par la personne qui m'aide et me supporte depuis déjà longtemps avec énormément de tendresse et pour qui merci n'est pas suffisant, Sylvie.

Résumé

Afin de maîtriser l'étape de fermentation intervenant dans la majorité des procédés traditionnels de transformations des racines de manioc, les caractéristiques de croissance et de production d'acide lactique d'un certain nombre de bactéries lactiques ont été examinées.

Parmi ces souches, *Lactobacillus plantarum* est apparu rapidement comme la souche la plus appropriée en raison de ses caractéristiques : acido-tolérance, taux de croissance rapide, production de biomasse et d'acide lactique élevées. En vue d'optimiser la production de biomasse de ce microorganisme, sa physiologie, et particulièrement l'influence du pH et du lactate sur sa croissance, ont été étudiées.

Par ailleurs, une souche de *L. plantarum* (A6) possédant une forte activité amylasique a été isolée à partir d'échantillons de manioc fermenté. Sa physiologie ainsi que les caractéristiques de l' α -amylase excrétée ont été étudiées. Les propriétés particulièrement intéressantes de cette souche pourraient donner lieu à des applications industrielles.

Au cours de cette étude, il a été démontré que les bactéries lactiques résistaient à des concentrations importantes de cyanure et qu'elles étaient capables, pour certaines d'entre elles, de dégrader la linamarine. Il a été noté, en particulier, que la souche *L. plantarum* A6 présentait à la fois une activité linamarase et une activité amylasique élevées lorsqu'elle était cultivée sur un milieu à base de cellobiose.

Enfin, des essais préliminaires d'inoculation du manioc avec la souche *L. plantarum* A6 ont été réalisés pour la production de gari (aliment traditionnel de l'Afrique de l'Ouest). Les résultats obtenus n'ont montré aucune amélioration notable dans la détoxification du manioc en raison de la présence d'une forte activité linamarase endogène. Par contre, cette souche pourrait jouer un rôle significatif dans le développement des qualités organoleptiques mais aussi dans la conservation et la standardisation du produit obtenu, grâce aux quantités élevées d'acide lactique produit et à la baisse plus rapide et plus importante du pH qui en résulte.

Mots-clés : manioc, bactéries lactiques, *Lactobacillus plantarum*, physiologie, enzymologie, amylase, linamarase, β -glucosidase, cyanure, détoxification, gari, starter.

Title : Contribution to the physiological and enzymological study of a new amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented cassava.

Abstract

The growth and lactic acid production characteristics of a number of lactic acid bacteria were investigated in order to control the fermentation stage in most traditional methods of processing cassava root.

Lactobacillus plantarum was soon found to be the most suitable strain because of its characteristics : acid tolerance, high growth rate and high biomass and lactic acid production. The physiology of the strain and in particular the influence of pH and lactate on growth were studied in order to optimise biomass production.

An *L. plantarum* strain (A6) with strong amylase activity was isolated from samples of fermented cassava. Its physiology and the characteristics of the α -amylase excreted were studied. The particularly advantageous properties of this strain may lead to industrial applications.

It was shown that lactic acid bacteria withstood high concentrations of cyanide : some were able to break down linamarine. It was noted in particular that the strain *L. plantarum* (A6) possessed both high linamarase and amylase activities when cultured on cellobiose-based medium.

Finally, preliminary trials of cassava inoculation with *L. plantarum* (A6) were performed for production of gari (a traditional foodstuff in West Africa). The results did not reveal any noteworthy improvement in the detoxification of cassava owing to a high endogenous linamarase content. However, the strain may play a significant role in the development of organoleptic qualities and in the conservation and standardisation of the product obtained, thanks to the large quantities of lactic acid produced and the more rapid and substantial fall in pH.

Key words : cassava, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, physiology, enzymology, amylase, linamarase, β -glucosidase, cyanide, detoxification, gari, starter.

TABLE DES MATIERES

1 - INTRODUCTION	1
2 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
2.1 - Le manioc	3
2.1.1 - Généralités	3
2.1.2 - Description	3
2.1.3 - Caractéristiques culturelles	5
2.1.4 - Composition et aspects nutritionnels	6
2.1.5 - Production	7
2.1.6 - Utilisations	7
2.2 - Toxicité du manioc	9
2.2.1 - Caractère cyanogénique du manioc	9
2.2.2 - Les glucosides cyanogéniques du manioc	9
2.2.2.1 - Structure et propriétés	9
2.2.2.2 - Répartition des glucosides cyanogéniques dans la plante	10
2.2.3 - Dégradation des glucosides cyanogéniques du manioc	12
2.2.3.1 - Schéma général	12
2.2.3.2 - Hydrolyse enzymatique des glucosides cyanogéniques du manioc	13
. Les linamarases d'origine végétale	13
. Les linamarases d'origine microbienne	15
2.2.3.3 - Dissociation de l'acétone cyanohydrine	16
2.2.4 - Toxicologie	18
2.3 - Les transformations traditionnelles du manioc	19
2.3.1 - Le procédé traditionnel de fabrication du gari	19
2.3.2 - Détoxication du gari	21
2.3.3 - L'étape de fermentation lors de la fabrication du gari	23

2.4 - Les bactéries lactiques	25
2.4.1 - Définition	25
2.4.2 - Métabolisme énergétique des bactéries lactiques	26
2.4.2.1 - Métabolisme énergétique lié à la dégradation des sucres	26
2.4.2.2 - Métabolisme énergétique lié à l'excrétion de lactate	27
2.4.3 - Exigences nutritionnelles	28
2.4.4 - Rôles des bactéries lactiques dans les fermentations traditionnelles	29
2.4.4.1 - Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques	30
2.4.4.2 - Développement des qualités organoleptiques dans les aliments	32
2.5 - Conclusion	33
3 - MATERIEL ET METHODES	35
3.1 - Microorganismes	35
3.2 - Milieux de culture	36
3.3 - Conditions de culture	37
3.3.1 - Culture en Erlenmeyer	37
3.3.2 - Culture en bioréacteur	37
3.4 - Estimation de la population bactérienne	38
3.5 - Techniques des dosages biochimiques	38
3.5.1 - Dosages colorimétriques des sucres	38
3.5.1.1 - Dosage des sucres totaux	38
3.5.1.2 - Dosage des sucres réducteurs	39
3.5.1.3 - Dosage de l'amidon	39
3.5.2 - Dosage des acides organiques et des sucres par HPLC	40
3.5.3 - Dosage des protéines	41
3.6 - Dosage des différentes formes de cyanures	42
3.7 - Dosages des activités enzymatiques	45
3.7.1 - Dosage de l'activité amylase	45
3.7.2 - Dosage de l'activité aryl- β -glucosidase	45
3.7.3 - Dosage de l'activité linamarase	46
3.8 - Techniques de purification de l'α-amylase de <i>L. plantarum</i> A6	47
3.8.1 - Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium	47
3.8.2 - Ultrafiltration	47
3.8.3 - Chromatographie sur DEAE-Cellulose	47
3.9 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	48
3.9.1 - Description générale du système	48

3.9.2 - Révélation des gels	49
3.10 - Observation au microscope électronique à balayage	49
3.11 - Obtention de protoplastes	50
3.12 - Etudes sur le gari	51
4 - RESULTATS ET DISCUSSION	52
4.1 - Caractéristiques des bactéries lactiques et physiologie de <i>L. plantarum</i>	52
4.1.1 - Introduction	52
4.1.2 - Caractérisation de différentes souches de bactéries lactiques	53
4.1.2.1 - Caractérisation morphologique	53
4.1.2.2 - Caractérisation du type homo ou hétérofermentaire	54
4.1.2.3 - Comportement cinétique des bactéries lactiques cultivées en bioréacteur	56
4.1.3 - Physiologie de <i>L. plantarum</i>	59
4.1.3.1 - Cinétique de croissance et découplage énergétique de <i>L. plantarum</i>	59
4.1.3.2 - Effet du pH	60
4.1.3.3 - Effet du lactate	62
4.1.4 - Conclusion	65
4.2 - Isolement et physiologie d'une nouvelle souche amylolytique de <i>L. plantarum</i> (A6)	67
4.2.1 - Introduction	67
4.2.2 - Isolement, identification et sélection de <i>L. plantarum</i> A6	67
4.2.3 - Cinétiques de croissance de <i>L. plantarum</i> A6	72
4.2.4 - Caractérisation de l'amylase de <i>L. plantarum</i> A6	75
4.2.4.1 - Identification du type d'amylase	75
4.2.4.2 - Influence de la source de carbone sur la production d'amylase	78
4.2.4.3 - Influence du pH et de la température sur l'activité amylasique	80
4.2.5 - Conclusion	81
4.3 - Purification et caractérisation de l'α-amylase de <i>L. plantarum</i> A6	82
4.3.1 - Introduction	82
4.3.2 - Purification	82
4.3.3 - Caractérisation de l'enzyme purifiée	86
4.3.3.1 - Estimation du poids moléculaire	86
4.3.3.2 - Influence du pH	88
4.3.3.3 - Influence de la température	90
4.3.3.4 - Détermination des paramètres cinétiques	91

4.3.3.5 - Effets des ions et d'autres effecteurs enzymatiques	93
4.3.4 - Conclusion	97
4.4 - Dégradation de la linamarine par les bactéries lactiques	98
4.4.1 - Introduction	98
4.4.2 - Résistance des bactéries lactiques au cyanure	99
4.4.3 - Mise en évidence d'une activité linamarase chez différentes bactéries lactiques	100
4.4.4 - Influence de la source de carbone sur la production de linamarase	101
4.4.5 - Analyse par HPLC des produits de dégradation de la linamarine	102
4.4.6 - Dégradation par <i>L. plantarum</i> A6 de la linamarine extraite du manioc	103
4.4.7 - Mise en évidence de deux systèmes enzymatiques d'hydrolyse des β -glucosides	105
4.4.8 - Conclusion	108
4.5 - Production d'un starter de <i>L. plantarum</i> A6 et effet sur la fermentation du manioc	110
4.5.1 - Introduction	110
4.5.2 - Production d'un starter de <i>L. plantarum</i> A6	110
4.5.3 - Inoculation du manioc par <i>L. plantarum</i> A6	114
4.5.4 - Conclusion	121
5 - CONCLUSION GENERALE	122
6 - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125

LISTE DES ABREVIATIONS

ADP	:	adenosine 5'-diphosphate
AGV	:	acides gras volatils
AMP	:	adénosine 5'-monophosphate
AMPc	:	adénosine 5'-monophosphate cyclique
ATP	:	adénosine 5'-triphosphate
CNCM	:	Collection Nationale de Cultures de Microorganismes
CTP	:	cytosine 5'-triphosphate
DO	:	densité optique
DNS	:	acide dinitrosalicylique
DSM	:	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	:	dithiothréitol
EDTA	:	acide (éthylène dinitrilo)-tétraacétique
GTP	:	guanosine 5'-triphosphate
HPLC	:	chromatographie liquide haute performance
K_m	:	constante de Michaélis-Menten
min	:	minute
MS	:	matière sèche
MF	:	matière fraîche
NAD(H)	:	nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (réduit)
NADP(H)	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé (réduit)
n.d.	:	non déterminé
pNP	:	para-nitrophénol
pNPG	:	para-nitrophényl- β -D-glucopyranoside
Pi	:	phosphate inorganique
ppm	:	partie par million (unité de concentration)
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
tpm	:	tour par minute
UFC	:	unité formant colonie
UTP	:	uridine 5'-triphosphate
V_{max}	:	vitesse maximale
YATP	:	g de biomasse produite par mole d'ATP produite
Yp/s	:	g de produit formé par g de substrat consommé
Yx/s	:	g de biomasse produite par g de substrat consommé
μ	:	taux de croissance
*	:	non détecté

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) compte plus de 500 millions de consommateurs et constitue ainsi l'aliment de base de nombreux pays tropicaux d'Afrique, d'Asie et d'Amérique. A ce titre, il est considéré comme un élément clé de la lutte contre les problèmes de nutrition qui sévissent dans les pays africains et cela, malgré une certaine toxicité liée à la présence de glucosides cyanogéniques dans ses racines (linamarine principalement) et son caractère hautement périssable après sa récolte.

Les populations autochtones ont su élaborer toute une série de traitements permettant de stabiliser ce produit et de réduire sa toxicité. Néanmoins, depuis une vingtaine d'années, la consommation du manioc enregistre un recul devant la consommation de produits élaborés à partir de céréales importées (DE BRUIJN et FRESCO, 1989). Il en résulte une modification des habitudes alimentaires dans les zones urbaines, des répercussions non négligeables dans les zones rurales et une dépendance croissante vis-à-vis des produits importés.

Les raisons de ce recul résident principalement dans l'antagonisme existant entre les contraintes liées aux exigences technologiques de transformation des racines de manioc et les contraintes sociales et économiques inhérentes au mode de vie urbain.

Les mesures permettant d'enrayer le recul de la consommation du manioc nécessitent l'amélioration des procédés traditionnels au cours desquels se produit une fermentation spontanée et/ou l'élaboration de technologies nouvelles pour la transformation du manioc.

L'ensemble des auteurs s'accordent aujourd'hui à penser que la microflore lactique joue un rôle important dans l'obtention des caractéristiques organoleptiques désirées et dans la stabilisation des produits finaux obtenus. Par contre, la participation de cette microflore lactique dans la détoxification n'a pas été à ce jour clairement établie. Selon certains auteurs (IKEDIOBI et ONYIKE, 1982a ; OKAFOR et EJIOFOR, 1986), cette microflore pourrait intervenir dans l'hydrolyse des composés cyanogéniques, tandis que d'autres estiment que la dégradation de ces composés est essentiellement liée à la présence de la linamarase endogène du manioc (VASCONCELOS *et al.*, 1990).

Dans ce contexte, un programme multidisciplinaire (nutrition, microbiologie, technologie alimentaire...) et multilatéral (Togo, Congo, Colombie, Brésil, Mexique, France...) a été mis en place et a reçu un financement de la CEE. Ce programme, intitulé "Amélioration de la qualité des aliments fermentés à base de manioc" a pour finalité d'apporter des solutions technologiques permettant d'assurer la fabrication d'aliments de bonne qualité.

Le travail présenté ici s'inscrit dans le cadre de ce programme. L'objectif de cette étude était d'acquérir la maîtrise de l'étape de fermentation, afin de permettre l'obtention de produits traditionnels ou de produits nouveaux, de qualités nutritionnelles et organoleptiques plus constantes.

Nous avons été amenés à considérer, après une étude bibliographique approfondie sur le manioc et le rôle des bactéries lactiques dans les fermentations traditionnelles, que l'utilisation de "starters" de bactéries lactiques, présentant certaines propriétés métaboliques et physiologiques, pourrait permettre d'atteindre cet objectif.

Sur la base de ces considérations, nous nous sommes attachés, dans un premier temps, après avoir défini les propriétés que devrait posséder la souche idéale pour constituer un starter efficace des fermentations à base de manioc, à étudier les caractéristiques métaboliques d'un ensemble de souches appartenant aux quatre principaux genres de bactéries lactiques. La physiologie de *Lactobacillus plantarum*, microorganisme sélectionné pour ses capacités métaboliques, a été plus spécifiquement étudiée.

En raison de la forte teneur en amidon des racines de manioc (plus de 80%), nous nous sommes intéressés, dans un deuxième temps, aux bactéries lactiques amylolytiques. On peut supposer, en effet, que l'inoculation avec une souche présentant une telle propriété, permettrait d'augmenter les teneurs finales en acide lactique dans les aliments à base de manioc (acide organique principalement retrouvé dans certaines préparations considérées de bonne qualité). Au cours de cette étude, l'isolement, l'identification et la sélection d'une bactérie lactique amylolytique à partir de racines de manioc en cours de rouissage ont été réalisés. La physiologie de cette bactérie a été également étudiée.

Etant donné les caractéristiques originales de ce microorganisme et le peu d'études effectuées à ce jour sur les activités amylolytiques des bactéries lactiques, il nous a paru nécessaire d'étudier plus en détail cette activité enzymatique. La purification et la caractérisation de l'activité amyliasique extracellulaire synthétisée par ce microorganisme sont décrites.

Par ailleurs, l'élimination de la linamarine étant une étape cruciale pour assurer l'obtention d'aliments non toxique, la capacité des bactéries lactiques à hydrolyser ce composé a été recherchée.

Nous décrivons ensuite, l'effet de l'inoculation d'une souche, présentant la majorité des propriétés initialement définies, sur la fermentation du manioc. Nous nous sommes attachés enfin, dans une analyse synthétique, à tirer des conclusions et des enseignements permettant de faire le bilan de cette étude et de dégager les points que nous avons jugés essentiels.

**ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

2.1 - Le manioc

2.1.1 - Généralités

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est appelé communément manioc dans les pays francophones, cassava dans les pays anglophones, yuca ou mandioca en Amérique Latine. Le manioc trouve son origine au Vénézuéla (2700 av. J-C.) (SILVESTRE et ARRAUDEAU, 1983). Il a été introduit en Afrique par les Portugais, probablement vers le milieu du XVI^{ème} siècle, et en Asie à la fin du XVIII^{ème} siècle. Sa culture intensive et sa consommation ne se sont développées qu'à la fin du siècle dernier.

Cette plante, de la famille des Euphorbiacées, est capable de se développer dans des conditions climatiques difficiles et sur des sols médiocres. Elle représente la culture typique des pays en voie de développement.

2.1.2 - Description

Cette plante arbustive est composée d'une partie aérienne et d'une partie souterraine. La partie aérienne (photo 2.1) peut atteindre 2 à 4 m de hauteur. Elle est constituée d'une tige principale qui se divise en 3 branches plus petites, ramifiées à leur tour de la même manière. Les branches portent à leur extrémité de grandes feuilles palmées comportant 5 à 9 lobes.

La partie souterraine (photo 2.2) comprend des racines nourricières et des racines tubérisées. Les racines nourricières s'enfoncent profondément dans le sol (jusqu'à 1 m). Les racines tubérisées, moins profondes, disposées en faisceau et rayonnant à partir de la tige principale, sont au nombre de 5 à 10 par plant. Elles peuvent atteindre 20 à 80 cm de longueur, 5 à 20 cm de diamètre, et ont un poids variant entre 200 g et 5 kg. Ce sont principalement ces racines qui sont utilisées comme aliment. Elles sont généralement appelées tubercules (par abus de langage) et sont constituées des principaux éléments suivants (cf. fig. 2.1) :

- l'écorce, constituée de 2 parties : une partie externe comprenant des cellules subéreuses (liège) ; une partie interne, plus épaisse, de structure fibreuse, comprenant le phelloderme et le phloème,
- le cambium, tissu générateur de la racine, assurant la croissance de la plante,
- le cylindre central, composé de membranes cellulaires, de vaisseaux du xylème et de grains d'amidon,
- la moelle et le xylème primaire constitués de fibres qui contiennent la majeure partie des sucres indigestibles.



Photo 2.1 : plant de manioc



Photo 2.2 : racines de manioc

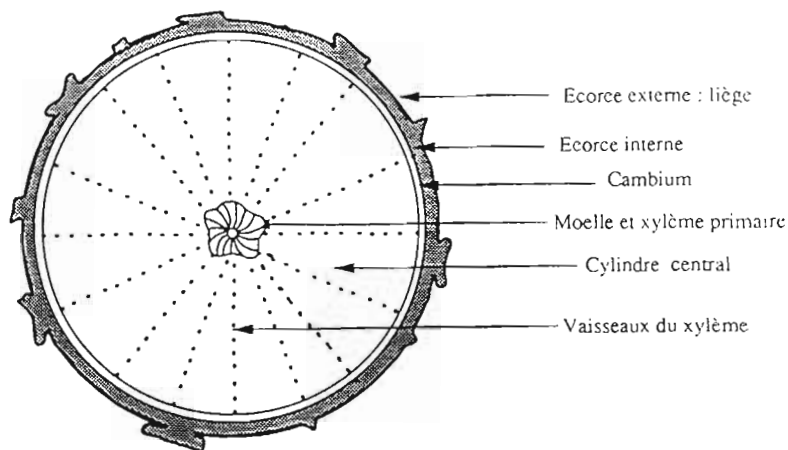


Figure 2.1 : Coupe schématique d'une racine de manioc (d'après GRACE, 1978)

2.1.3 - Caractéristiques culturelles

Avec un rendement raisonnable (9 à 10 T/ha), le manioc s'accommode de la grande diversité des conditions climatiques, des qualités de sols (parmi les plus pauvres et les plus acides) et des contraintes culturelles, qui caractérisent une large partie de l'Afrique, de l'Asie et de l'Amérique Latine (COOKE et COCK, 1989).

Il est considéré comme l'un des plus efficaces, des plus sûrs, et des plus économiques convertisseurs d'énergie solaire en carbohydrates (COOKE et COCK, 1989). D'autre part, le manioc n'exige aucun travail du sol ni aucun soin particulier jusqu'à sa récolte. Il peut se conserver en terre jusqu'à deux ans après maturité, protégeant ainsi les consommateurs des aléas des récoltes et des disettes.

Le manioc est reproduit par simple bouturage. La partie aérienne de la plante se développe en 3 à 4 mois, les tubercules commencent alors à se former. Ceux-ci sont récoltés 7 à 18 mois après la plantation, suivant les variétés et les besoins (COCK, 1982).

La détérioration du manioc peut commencer dès que les racines ont été déterrées. Une détérioration primaire débute au deuxième jour et apparaît sous forme de stries bleues et noires. Elle est due à l'action des enzymes oxydantes qui produisent des phénols, qui polymérisent ensuite pour donner des tanins. Elle est suivie d'une détérioration secondaire due aux microorganismes, (COOKE et COCK, 1989).

Etude bibliographique

Le plant de manioc présente une bonne résistance aux maladies. Cependant, les rendements de production peuvent baisser de 20 à 90% sous l'action d'agents phytopathogènes variés, tels que bactéries, virus, champignons ou encore cochenilles et acariens (JENNINGS, 1970). Enfin, sa teneur en composés cyanurés lui confère une toxicité qui peut le protéger contre certains prédateurs (herbivores, champignons, insectes...).

2.1.4 - Composition et aspects nutritionnels

Le tubercule de manioc est un aliment essentiellement énergétique. Il peut contenir jusqu'à 86 % d'amidon (CHUZEL, 1985), assez bien pourvu en acide ascorbique (80 mg/100 g MS) mais pauvre en lipides, sels minéraux, autres vitamines et surtout protides (SILVESTRE et ARRAUDEAU, 1983). Sa pauvreté en éléments nutritifs autres que les glucides, explique les préventions des nutritionnistes.

Dans les tubercules, les acides aminés sont mal équilibrés et plusieurs des acides aminés soufrés sont limitants.

Tableau 2.1 : Composition des racines entières et des feuilles de manioc (SILVESTRE et ARRAUDEAU, 1983)

	Racines	Feuilles
Mat. Sèche.....% MF	35	15
Glucides.....% MS	89	41
Lipides.....% MS	1	6
Protides.....% MS	2,5	25
Fibres.....% MS	4,5	20
Cendres.....% MS	3	8
Calcium.....% MS	0,1	1,4
Phosphore% MS	0,1	0,5
Fer% MS	0,003	0,03
Sodium% MS	0,003	0,02
Potassium% MS	1	2

Il est à noter que dans certaines régions, les feuilles du manioc sont également consommées, ce qui constitue un apport supplémentaire en protéines non négligeable.

L'un des moyens d'améliorer la qualité nutritionnelle du manioc est d'utiliser des microorganismes (*Aspergillus*, *Rhizopus*) qui produisent des protéines en se développant sur les hydrates de carbone du manioc, grâce à une légère stimulation par addition d'azote inorganique (BROOK *et al.*, 1969 ; RAIMBAULT *et al.*, 1985 ; DAUBRESSE *et al.*, 1987). Pour exemple,

Etude bibliographique

nous citerons les derniers travaux de SOCCOL (1992) qui ont permis d'obtenir par fermentation en milieu solide, des teneurs finales en protéines de 12 à 14%, en utilisant une souche de *Rhizopus oryzae*.

Le manioc frais contient également des composés cyanogéniques, présents en quantités variables selon la variété du plant et selon la partie d'un même plant. Ils confèrent à cette plante une toxicité importante pouvant avoir de graves conséquences sur la santé des consommateurs (cf. § 2.2).

2.1.5 - Production

La production mondiale de manioc en 1990 était de 158 millions de tonnes réparties sur 15,6 millions d'hectares (FAO, 1990). Avec 40% de la production mondiale, l'Afrique est le premier continent producteur de manioc devant l'Asie et l'Amérique du sud. Les cinq pays les plus gros producteurs sont le Nigéria, le Brésil, la Thaïlande, le Zaïre et l'Indonésie (cf. tab. 2.2).

Tableau 2.2 : Les cinq pays les plus gros producteurs de manioc (Estimation F.A.O. 1990)

Pays	Production Mt	Rendement t/ha
Nigéria	26,0	15,3
Brésil	24,6	12,6
Thaïlande	20,7	13,9
Zaïre	17,5	7,7
Indonésie	17,1	12,2

Bien qu'il constitue la quatrième source d'hydrates de carbone après le riz, la canne à sucre et le maïs dans les zones tropicales, le manioc présente le meilleur rendement calorique (12,2 millions de kilocalories par hectare), ce qui le place loin devant le maïs, l'igname, la patate douce et le riz, dont les rendements caloriques moyens sont respectivement de 7,6 ; 7,1 ; 6,5 et 5 millions kcal/ha (GRIFFON, communication personnelle).

2.1.6 - Utilisations

Environ 60% du manioc produit est destiné à la consommation humaine, et un tiers à l'alimentation animale. Le reste est transformé en produits secondaires comme l'amidon ou l'éthanol...(cf. fig. 2.2).

C'est en Afrique que la consommation de manioc est la plus importante avec une moyenne de

102 kg par personne et par an soit 230 kcal/pers/j. Plus de 50 millions de personnes (principalement au Zaïre, au Congo et au Gabon) consomment au moins 500 kcal par jour sous forme de manioc (COCK, 1982).

Il résulte de l'utilisation et surtout de la transformation du manioc pour l'alimentation humaine, une grande quantité de déchets et de sous-produits peu valorisés (épluchures, jus de presse, extrémités...). Ceux-ci sont principalement utilisés pour l'alimentation animale. Leur utilisation dans l'industrie est très faible car il a été montré que la plupart des essais de valorisation (production d'acides, d'alcool, de méthane, de sirops...) étaient économiquement peu rentables (GHILDYAL et LONSANE, 1990). Nous citerons néanmoins les travaux de CUZIN *et al.* (1992) sur la fermentation méthanique des épluchures de manioc en fermenteur Transpaille, qui ont révélé une potentialité intéressante pour la production de biogaz.

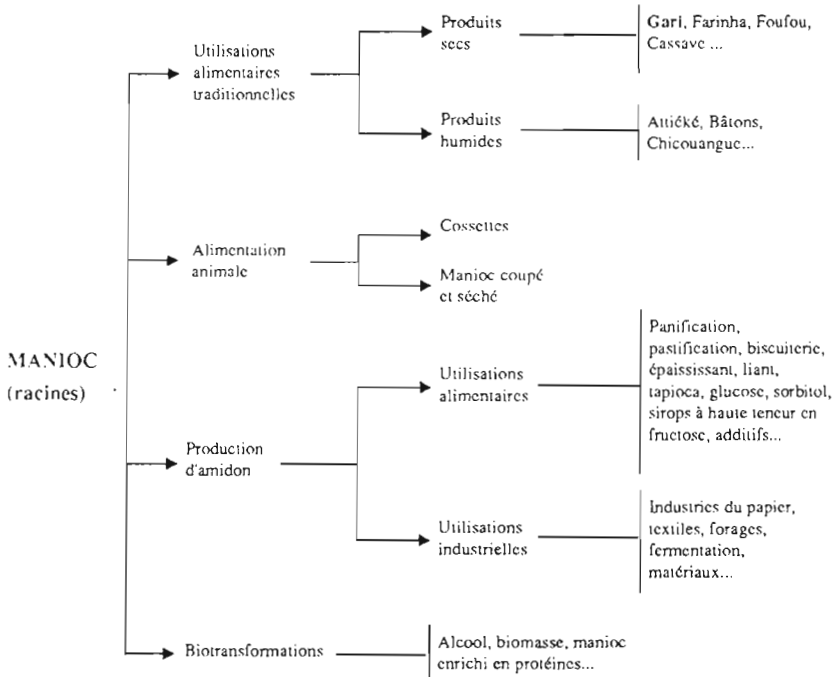


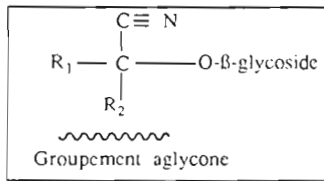
Figure 2.2 : Utilisations des racines de manioc (MUCHNICK et VINCK, 1984)

2.2 - Toxicité du manioc

2.2.1 - Caractère cyanogénique du manioc

Les tissus de manioc ont la propriété d'émettre, dans certaines conditions, de l'acide cyanhydrique (HCN). Cette propriété, appelée cyanogénèse, est très fréquente dans le règne végétal, et a été recensée chez plus de 1000 espèces appartenant à 90 familles (DILLEMAN, 1958 cité par DE BRUIJN, 1971). Elle est retrouvée également chez de nombreux microorganismes (KNOWELS, 1976 ; KNOWELS et BUNCH, 1986) ainsi que chez certains insectes (FRANZL *et al.*, 1989).

L'acide cyanhydrique ne se trouve pas à l'état libre dans les tissus végétaux mais sous forme de dérivés d' α -hydroxynitriles (cyanohydrine). La plupart de ces composés chimiques appartiennent au groupe des glycosides cyanogéniques (23 composés recensés) et 4 seulement au groupe des lipides cyanogéniques (CONN, 1980). Les glycosides cyanogéniques sont des hétérosides constitués d'un sucre et d'un groupement aglycone. Leur formule générale est :



Les radicaux R1 et R2 peuvent être un hydrogène, un groupement alkyle ou aryle. Quand le sucre est un glucose, on parle de glucoside cyanogénique. Parmi les glucosides cyanogéniques, les plus importants sont l'amygdaline de l'amande amère, la dhurrine du sorgho, la linamarine et la lotaustraline du manioc rencontrées également chez le trèfle rampant, le lin, certains lotus, l'hévéa...

2.2.2 - Les glucosides cyanogéniques du manioc

2.2.2.1- Structure et propriétés

C'est en 1906 que DUNSTAND *et al.* ont identifié dans les tissus de manioc, la linamarine autrefois appelée "phaséolutine", longtemps considérée comme le seul composé cyanogénique.

Etude bibliographique

BUTLER (1965) a mis en évidence que la présence de linamarine chez les plantes était la plupart du temps associée à celle de son homologue, la lotaustraline (méthyl linamarine). BUTLER *et al.* (1965) ont également déterminé que dans ces deux composés, la liaison glucosidique était de type β . Ces deux glucosides cyanogéniques se trouvent en proportion très variable d'une plante à l'autre. Dans le cas du manioc, le rapport linamarine/lotaustraline est de 93/7, ce qui montre que la linamarine est de loin le composé cyanogénique le plus important. La linamarine et la lotaustraline, comme l'ensemble des glucosides cyanogéniques, possèdent un goût "amer". Les propriétés de la linamarine sont résumées dans le tableau 2.3.

La biosynthèse des glucosides cyanogéniques dans les plantes est réalisée à partir d'acides aminés. La linamarine dérive de la valine alors que la lotaustraline provient de l'isoleucine (NARTEY, 1968 ; CONN, 1979).

Tableau 2.3 : Propriétés de la linamarine (WINDHOLZ *et al.*, 1983. MERCK INDEX)

<p>LINAMARINE : 2-(β-D-Glucopyranosyloxy)-2-méthylpropanenitrile ou 2-hydroxy isobutyronitril β-D-glucose ou phaséolunatine. $C_{10}H_{17}NO_6$ 274,24 g/mol Solide, point de fusion : 142°C Pouvoir rotatoire à 25°C : -29° Très soluble dans l'eau, l'alcool froid et l'acétone chaud. Peu soluble dans l'éther, le benzène et le chloroforme. Insoluble dans l'éther de pétrole.</p>

La fonction de ces glucosides cyanogéniques dans la plante a fait l'objet de diverses hypothèses : simples produits d'excrétion, rôle de protection de la plante, réserve de carbone et d'azote pour les biosynthèses organiques. On s'accorde aujourd'hui à penser que seul le rôle de protection pourrait être effectif. La libération d'acide cyanhydrique lors de la destruction des tissus de la plante pourrait conférer à celle-ci une résistance à l'attaque de prédateurs, de parasites ou de microorganismes. Cependant, un tel rôle n'a pas été clairement démontré (HRUSKA, 1988).

2.2.2.2 - Répartition des glucosides cyanogéniques dans la plante

La présence des glucosides cyanogéniques a été observée dans tous les clones du manioc, que les variétés soient réputées douces ou amères, et dans toutes les parties de la plante à l'exception des graines sèches des variétés douces (NARTEY, 1968). Toutefois, un clone non cyanogène, autrefois observé par Bolhius, aurait été perdu pendant la seconde guerre mondiale (Cassava program Review CIAT 1972, cité dans SILVESTRE et ARRAUDEAU 1983).

Si le facteur génétique joue un rôle capital sur les teneurs en glucosides cyanogéniques, celles-ci peuvent varier de façon notable avec les conditions de milieu : richesse du sol, apport en matière organique, potasse et azote, luminosité, conditions climatiques, âge de la plante... (DE BRUIJN, 1971). Ainsi, GRACE (1978) cite l'exemple de variétés inoffensives au Bénin qui se sont révélées toxiques sur les sols forestiers du Nigéria, ou inversement des types "amers" provenant de la Jamaïque, devenus sans danger au Costa-Rica.

La répartition des glucosides cyanogéniques dans la plante est très variable comme le montre le tableau 2.4. Notons en particulier au niveau de la racine, que les teneurs sont beaucoup plus élevées dans l'écorce que dans la partie centrale. COOKE (1978) a également mis en évidence un gradient radial croissant du centre vers la périphérie de la racine (jusqu'à 10 fois plus) et un gradient longitudinal nettement plus faible. INDIRA et MANUJAM (1987) ont, pour leur part, observé une variation de la distribution de ces composés en fonction de l'âge de la plante. D'après YEOH et OH (1979), aucune relation significative n'existerait entre les teneurs en cyanure dans les différents organes de la plante. COOKE *et al.* (1978a) ont montré par ailleurs que la quantité en cyanures variait considérablement entre les racines d'un même plant, ainsi qu'entre des plants ayant poussé dans les mêmes conditions et appartenant au même champ.

Tableau 2.4 : Répartition des glucosides cyanogéniques (en ppm d'HCN sur matière fraîche) dans différentes parties de plantes de manioc, teneurs calculées à partir de 6 clones (d'après DE BRUIJN, 1971).

Partie de la plante	Teneur en HCN mini et maxi (ppm)	Teneur Moyenne
Feuille :		
. Limbe		
- très jeune	330-790	520
- jeune adulte	340-1040	630
- âgé	210-730	400
. Pétiole		
- très jeune	400-960	780
- jeune adulte	210-650	380
- âgé	110-180	140
Ecorce des tiges :		
- haut	270-1330	550
- bas	550-970	770
Racine :		
. Ecorce	400-970	660
. Partie centrale	36-240	140

2.2.3 - Dégradation des glucosides cyanogéniques du manioc

2.2.3.1 - Schéma général

COLLARD et LEVI (1959), pour tenter d'expliquer la détoxication du manioc observée au cours de sa transformation en gari (cf. § 2.3), avaient proposé une théorie selon laquelle la baisse du pH, due à la production d'acides organiques par les microorganismes au cours de l'étape de fermentation, provoquerait une hydrolyse spontanée des glucosides cyanogéniques.

Cependant, WOOD (1966), en montrant que la linamarine était particulièrement stable en milieu acide dilué, même à 100°C, infirme cette hypothèse. Par ailleurs, suite aux travaux de BUTLER *et al.* (1965), il a démontré que la décomposition des glucosides cyanogéniques était due à une enzyme présente dans le manioc, appelée linamarase. Enfin, en 1969, CONN propose un mécanisme de décomposition de la linamarine se déroulant en deux étapes (cf. fig. 2.3) :

a) hydrolyse enzymatique des glucosides cyanogéniques avec formation des cyanohydrines correspondants (acétone pour la linamarine, méthyl-éthyl cétone pour la lotaustraline).

b) dissociation spontanée de l'acétone cyanohydrine. Cette dissociation peut cependant être accélérée par une enzyme, une hydroxynitrile lyase, présente également dans le manioc.

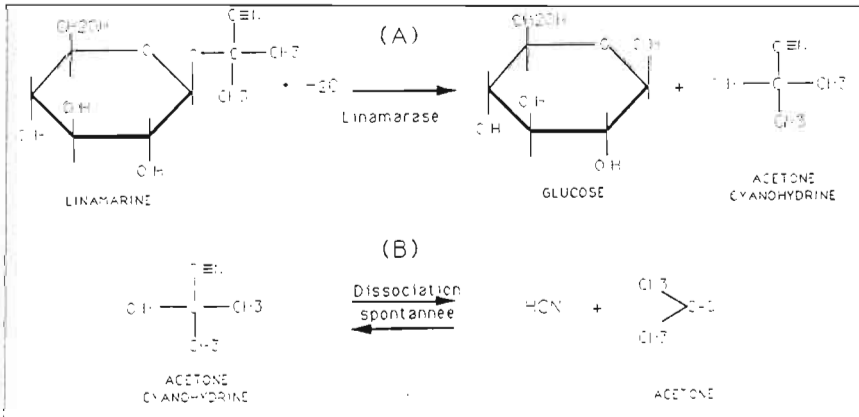


Figure 2.3 : Schéma de dégradation de la linamarine (CONN, 1969)

2.2.3.2 - Hydrolyse enzymatique des glucosides cyanogéniques du manioc

Les linamarases d'origine végétale

L'ensemble des plantes cyanogéniques, à quelques exceptions près, synthétisent une enzyme endogène (β -glucosidase) qui permet l'hydrolyse des glucosides cyanogéniques correspondants. Ainsi, dans le cas du manioc, on trouve la linamarase qui est responsable de l'hydrolyse de la linamarine et de la lotaustraline.

Outre les nombreux travaux réalisés sur la linamarase du manioc (WOOD, 1966 ; COOKE *et al.*, 1978b ; YEOH et SIA, 1987 ; EKSITTIKUL et CHULAVATNATOL, 1988 ; YEOH, 1989 ; MKPONG *et al.*, 1990), cette enzyme a été étudiée chez d'autres plantes, en particulier le trèfle blanc (BUTLER *et al.*, 1965 ; KAKES, 1985 ; DUNN *et al.*, 1988 ; POCSI *et al.*, 1989), l'hévéa (SELMAR *et al.*, 1987), le lin (BUTLER *et al.*, 1965 ; FAN et CONN, 1985) et le haricot de Lima (ITOH-NASHIDA *et al.*, 1987 ; ISTOCK *et al.*, 1990).

Le tableau 2.5 résume les propriétés physico-chimiques de ces différentes linamarases. Il apparaît que ces enzymes sont formées de sous-unités de poids moléculaire variant de 59 à 66 kDa selon leur origine et présentent un optimum d'activité à pH légèrement acide (proche de 6) et à une température assez élevée (proche de 55°C).

La linamarine est localisée dans les vacuoles des cellules, tandis que la linamarase se trouve dans la paroi cellulaire (MKPONG *et al.*, 1990). Les cellules doivent donc être détruites pour permettre le contact entre l'enzyme et son substrat.

La linamarase du manioc présente une spécificité large. En effet, outre la linamarine et la lotaustraline, elle peut hydrolyser d'autres glucosides cyanogéniques telles que la prunassine et la saliciline, ainsi que certains β -glucosides artificiels (pNP- β -D-glucose, pNP- β -D-fucose, pNP- β -D-galactose, pNP- β -D-mannose...). Cependant, elle ne présente pas ou peu d'activité sur l'amygdaline ainsi que sur les diglucosides tels que le cellobiose, le maltose, le pNP- β -D-lactose... (YEOH, 1989). Il est à noter que les valeurs de K_m pour les pNP- β -D-monglycosides sont généralement plus faibles que celles mesurées avec la linamarine.

La concentration de linamarase dans la plante varie avec son âge, l'organe considéré et le clone d'origine ; Le tableau 2.6 illustre cette variabilité. Ainsi, l'activité maximale est retrouvée dans les feuilles jeunes (DE BRUIJN, 1971). Au niveau de la racine, l'activité est plus importante dans l'écorce que dans le cylindre central (COOKE et DE LA CRUZ, 1982).

Tableau 2.5 : Résumé des caractéristiques générales de quelques linamarases végétales (d'après CUZIN, 1991) et microbiennes

Source	K_m (mM)	PM total (kDa)	PM sous unité (kDa)	pH opt	Temp. opt	Références	
Trèfle blanc (<i>Trifolium repens</i>)	4,3 a	dimère	62			BUTLER <i>et al.</i> (1965), DUNN <i>et al.</i> (1988) POCSI <i>et al.</i> (1989)	
Haricot de Lima graine (<i>Phaseolus lunatus</i>)	5,6 a	124	59	5,2		ITOH-NASHIDA <i>et al.</i> (1987) ISTOCK <i>et al.</i> (1990)	
Lin graine (<i>Linum usitatissimum</i>)	8,2 a	décamère	62,5-65	5,5-6		BUTLER <i>et al.</i> (1965) FAN et CONN (1985)	
Arbre à caoutchouc feuilles (<i>Hevea brasiliensis</i>)	7,6 a 1 b		64	5,6	62°C	SELMAR <i>et al.</i> (1987)	
Manioc (<i>Manihot esculenta</i>)	tissu parenchymal et écorce	1,45 a 0,46 b	600	6 6,4		COOKE <i>et al.</i> (1978b)	
	pétiole, tige et cortex tubercules	0,6 a		63		EKSITTIKUL et CHULAVATNATOL (1988)	
	feuilles	2,08 a 0,45 b			6,5 7	60°C 55°C	YEOH (1989) YEOH et SIA (1987) MKPONG <i>et al.</i> (1990)
		1,9 a		65			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		145		6,0-6,5	29°C	OKAFOR et EJIOFOR (1985)	
<i>Fusarium equiseti</i>	0,51 a			6,0	45°C	IKEDIOBI <i>et al.</i> (1987)	
<i>Brevibacterium</i> sp.	3,7 a	180	90	6,0	50° C	LEGRAS <i>et al.</i> (1989)	

a: K_m pour linamarine

b: K_m pour pNPG

Tableau 2.6 : Répartition de l'activité linamarase (en μg d'HCN libérés par g de matière fraîche par minute) dans différentes parties de plantes de manioc, calculé à partir de 4 clones (d'après DE BRUIJN, 1971).

Partie de la plante	Activité linamarase mini et maxi	Activité linamarase moyenne
Feuille :		
Limbe		
- très jeune	450-1000	700
- jeune adulte	100-600	300
- âgé	10-200	100
Pétiole		
- très jeune	350-1150	750
- jeune adulte	200-550	350
- âgé	250-600	375
Ecorce des tiges :		
- haut	130-170	150
- bas	0-15	6
Racines :		
Ecorce	140-480	260
Partie centrale	6-13	9

DE BRUIJN (1971) suggère à partir de ces observations, de rajouter du jus de feuilles ou d'écorce des tubercules dans la pulpe de manioc, pour accélérer la dégradation des glucosides cyanogéniques lors de la fabrication du gari (cf. § 2.3.1).

Les linamarases d'origine microbienne

Les β -glucosidases sont très répandues chez les microorganismes. Celles-ci ont été largement étudiées ces dernières années, car elles constituent le maillon final de la voie de dégradation de la cellulose. Ainsi, SCHLIEMANN (1983) fait référence à plus de 600 articles traitant de β -glucosidases d'origine microbienne.

Parmi ces différents travaux, plusieurs auteurs ont mis en évidence la présence de β -glucosidases chez certains microorganismes capables de dégrader la linamarine (IKEDIOBI et ONYIKE, 1982a ; PADMAJA et BALAGOPAL, 1985 ; OKAFOR et EJIOFOR, 1986 ; LEGRAS *et al.*, 1989 ; OKAFOR et EJIOFOR, 1990). On trouve ainsi des champignons (*Fusarium equiseti*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium steckii*...), des levures (*Schawniomyces alluvius*, *Saccharomyces* sp...) et quelques bactéries (*Brevibacterium* sp, *Leuconostoc mesenteroides*, *Alcaligenes faecalis*...) qui ont été décrits comme capables de dégrader la linamarine.

Le tableau 2.5 résume les propriétés de quelques unes des linamarases qui ont été étudiées de façon plus approfondies. Les quelques études réalisées ne nous permettent pas de généraliser ces informations à l'ensemble des microorganismes. Nous pouvons seulement noter que ces enzymes ont un pH optimum proche de 6 et une température optimale qui varie de 30°C à 50°C. Les valeurs de K_m rapportées sont relativement proches des valeurs rencontrées pour les linamarases d'origine végétale.

Le nombre relativement restreint de souches décrites dans la littérature présentant une telle capacité, ne traduit pas forcément ce qui se passe réellement dans la nature, mais souligne plutôt un manque d'études dans le domaine considéré. En effet, OKAFOR et EJIOFOR (1990) observent que toutes les souches isolées du manioc fermenté, capables de dégrader le pNPG (para nitrophényl- β -D-glucopyranoside), sont aussi capables d'hydrolyser la linamarine. Ils suggèrent ainsi que les microorganismes impliqués durant l'étape de fermentation du manioc, pourraient intervenir également dans la détoxification des composés cyanogéniques. Cependant, aucune étude, à notre connaissance, n'a été réalisée pour déterminer le rôle joué par la microflore naturelle dans la détoxification du manioc.

2.2.3.3 - Dissociation de l'acétone cyanohydrine

L'acétone cyanohydrine peut être dissocié par voie chimique, mais probablement aussi par voie enzymatique, en présence d'hydroxynitrile lyase, comme l'a suggéré CONN (1969), par analogie aux mécanismes mis en évidence pour la dhurrine du sorgho (SEELY *et al.*, 1966).

La stabilité de la cyanohydrine à différents pH a été étudiée par COOKE (1978) puis par FORMUYAN *et al.* (1985). Comme le montre la figure 2.4, l'acétone cyanohydrine est particulièrement stable en milieu acide, l'équilibre entre l'acétone cyanohydrine et l'acide cyanhydrique s'instaurant pour un pH voisin de 5.

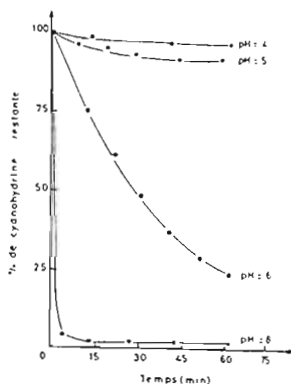


Figure 2.4 : Stabilité de l'acétone cyanohydrine à différents pH à 30°C (d'après COOKE, 1978)

Il apparaît donc que le cyanure se trouve dans le manioc sous trois formes : composés glucosidiques (linamarine et lotaustaline), cyanohydrines et acide cyanhydrique libre. Nous pouvons donc distinguer une forme "libre" et une forme "liée" qui ne recouvrent pas les mêmes composés suivant les auteurs. Nous retiendrons la définition suivante (COOKE, 1978 ; COOKE et COURSEY, 1981) : une forme "liée" (linamarine et lotaustaline) et une forme "libre" non glucosidique (cyanohydrines, et HCN). Les tableaux 2.7 et 2.8 résument respectivement les propriétés de l'acétone cyanohydrine et de l'acide cyanhydrique.

Tableau 2.7 : Propriétés de l'acétone cyanohydrine (WINDHOLZ *et al.*, 1983. MERCK INDEX)

Acétone cyanohydrine	
2-Hydroxy-2-méthylpropanenitrile ou α -hydroxyisobutyronitrile	
C_4H_7NO	85,10 g/mol
Liquide, point de fusion : $-19^\circ C$, densité à $25^\circ C$: 0,927	
Point d'ébullition à 1 atm : $95^\circ C$	
Indice de diffraction à $19^\circ C$: 1,400	
Très miscible dans l'eau, et les solvants organiques usuels.	
Insoluble dans l'éther de pétrole.	
Se décompose rapidement pour former de l'HCN.	

Tableau 2.8 : Propriétés de l'acide cyanhydrique (WINDHOLZ *et al.*, 1983. MERCK INDEX)

Acide cyanhydrique	
ou acide hydrocyanique ou acide prussique	
CHN	27,03 g/mol
$HCN \rightleftharpoons H^+ + CN^-$ pKa 9,3	
Liquide ou gazeux; point d'ébullition : $25,6^\circ C$.	
Point de fusion: $-13,4^\circ C$.	
Densité à l'état gazeux : 0,941; densité à l'état liquide : 0,687	
Très miscible dans l'eau et l'alcool.	
Peu miscible dans l'éther.	
Incolore, odeur caractéristique d'amande.	
Très toxique, CL ₅₀ chez le rat : 554 ppm (5 min).	
Dose létale moyenne chez l'homme : 50 à 60 mg	

Il convient également de remarquer que, dans le mécanisme de dégradation des composés cyanogéniques, la dissociation des cyanohydrines est une étape tout aussi limitante, voire plus, que l'hydrolyse des glucosides cyanogéniques (COOKE et DE LA CRUZ, 1982).

Notons enfin que des réactions secondaires peuvent intervenir au cours de la décomposition des composés cyanogéniques, qui piègent l'HCN libéré. Ainsi, la présence de β -cyanoalanine synthase (NARTEY, 1973) et de rhodanèse (CHEW, 1973), deux enzymes qui conduisent à l'assimilation d'HCN, a été mise en évidence dans les tissus de la plante. Cependant, en ce qui concerne la rhodanèse, il faut souligner que des études récentes (LIEBERI et SELMAR, 1990 ; CUZIN et LABAT, 1992) remettent en cause les résultats de CHEW (1973), et par conséquent sa présence dans les tissus de manioc .

2.2.4 - Toxicologie

Comme nous l'avons vu, la toxicité du manioc est associée à la présence d'HCN "libre", qui est un inhibiteur puissant de nombreuses réactions enzymatiques (métalloenzymes principalement). Il bloque, en particulier, la cytochrome oxydase, enzyme clé de la respiration cellulaire.

Les êtres humains, comme les animaux, sont capables de détoxifier une certaine quantité de cyanures dans leurs tissus. Le principal mode de détoxification dans l'organisme met en jeu une enzyme, la rhodanèse, et des composés soufrés (sulfates ou certains acides aminés, notamment cystéine et cystine) pour donner des sulfocyanures éliminés dans l'urine. Tous les tissus contiennent la rhodanèse et tout particulièrement le foie, qui est le principal centre de détoxification. D'autres voies sont possibles, notamment par la vitamine B12, et au niveau de la thyroïde (OKE, 1973).

Ainsi, selon les quantités ingérées, la rapidité d'ingestion et la vitesse de détoxification, les taux d'HCN dans l'organisme peuvent ou non atteindre des valeurs qui provoquent des intoxications aiguës (50 à 60 mg représentant la dose létale pour un homme adulte). Des taux relativement faibles ne sont pas cependant sans danger et peuvent entraîner des troubles chroniques (OSUNTOKUN, 1972; DELANGE *et al.*, 1973), tels que : le crétinisme, la neuropathie ataxique (incoordination des mouvements), le goitre (trouble d'absorption de l'iode par la thyroïde), le diabète tropical.

Si l'on s'est assuré au préalable de la destruction de l'enzyme endogène, les glucosides cyanogéniques ne sont pas toxiques par eux-mêmes, car ils sont stables dans les conditions de température et d'acidité rencontrées dans l'estomac (MONTGOMERY, 1969). Plus récemment, la possibilité d'hydrolyse des glucosides par des enzymes de la flore intestinale a été envisagée. Ainsi, les travaux de PHILBRICK *et al.* (1977) ont montré que la linamarine ingérée pure ne présentait pas le degré de toxicité de l'acide cyanhydrique mais conduisait à des troubles physiologiques et métaboliques. De même, les risques d'intoxication dus à l'ingestion de cyanohydrines ne sont pas parfaitement connus.

Notons que les problèmes associés à la toxicité du manioc sont rencontrés uniquement en Afrique de l'Ouest, dans des zones très restreintes, où les techniques de transformation des racines sont rudimentaires et où les quantités d'iode, de protéines et d'acides aminés soufrés absorbés quotidiennement sont faibles (COCK, 1982). Ainsi, dans le Kerala, au sud de l'Inde, où la consommation de manioc par habitant est supérieure à 700 kcal/jour, aucune toxicité chronique due au cyanure n'a été reportée. La quantité de protéines consommées dans cette région, principalement fournies par une alimentation à base de poisson, est faible, mais le contenu en acides aminés est bien équilibré.

Il apparaît ainsi que les problèmes de toxicité liés au manioc, devraient pouvoir complètement disparaître par l'extension de techniques adaptées à la transformation des racines et par l'apport d'un complément nutritionnel adéquat à la ration alimentaire journalière.

Etude bibliographique

2.3 - Les transformations traditionnelles du manioc

La transformation du manioc, indispensable en raison de son caractère périssable et toxique, reste en Afrique une technologie essentiellement familiale et artisanale. Compte tenu des coutumes de la société africaine qui imposent le partage du travail, c'est à la femme que reviennent les tâches de transformation et de commercialisation du produit fini. Ce système traditionnel permet non seulement de stabiliser une importante population en zones rurales, mais aussi, d'approvisionner les grandes agglomérations comme Lagos, Lomé ou Abidjan en gari ou attiéké (GRIFFON et GAUTHIER, 1984, cités par CHUZEL, 1985).

Les principales transformations artisanales traditionnelles sont décrites dans la figure 2.5. La plupart de ces transformations sont spécifiques, ou pratiquées avec des variantes selon les régions et les ethnies.

Dans cette revue bibliographique, nous nous intéresserons plus particulièrement à un aliment: le gari (semoule de manioc) largement diffusé en Afrique de l'Ouest, en présentant le processus de détoxification et de fermentation intervenant au cours de sa préparation.

2.3.1 - Le procédé traditionnel de fabrication du gari

Le gari est une semoule de manioc cuite et séchée, dont les caractéristiques organoleptiques (goût, acidité, granulométrie, couleur, croustillant...) varient d'une région à l'autre et d'une ethnie à l'autre.

Il est utilisé dans différentes préparations culinaires : additionné de lait ou d'eau froide avec du sucre, mélangé à des arachides grillées et de la noix de coco fraîche, en bouillie avec des sauces à base de légumes ou de viande, gonflé à l'eau puis égoutté et frit...

Traditionnellement, le gari est préparé de la manière suivante (CHUZEL et GRIFFON, 1989) : les racines de manioc fraîchement déterrées sont décollées puis épluchées à la main, afin d'éliminer les écorces externe et interne. Les racines sont ensuite lavées pour éliminer les traces de terre, puis râpées sur un morceau de tôle perforée.

La pulpe ainsi obtenue est versée dans des paniers en paille tressées ou dans des sacs de toile de jute sur lesquels on dispose de lourdes pierres pour faciliter l'égouttage du produit pendant la période de fermentation qui varie de 2 à 8 jours. Au terme du pressage, la pulpe a un taux d'humidité de 50% environ.

La pulpe fermentée et pressée, est alors émiétée et défibrée dans un tamis à mailles en osier ou en lianes. Le produit est ensuite cuit et séché dans un canari en argile déposé sur un feu de bois, tout en étant mélangé afin d'empêcher la formation de grumeaux et pour contrôler les propriétés rhéologiques et le séchage. Le gari peut éventuellement être tamisé à nouveau s'il y a eu formation de grumeaux.

Ainsi, à partir de 100 kg de tubercules de manioc, on produit 20 kg de gari dont la faible humidité de 10% lui confère une grande aptitude à la conservation. D'autre part, l'étape de cuisson permet la gélatinisation partielle de l'amidon (environ 70% de l'amidon total), ce qui améliore sa digestibilité.

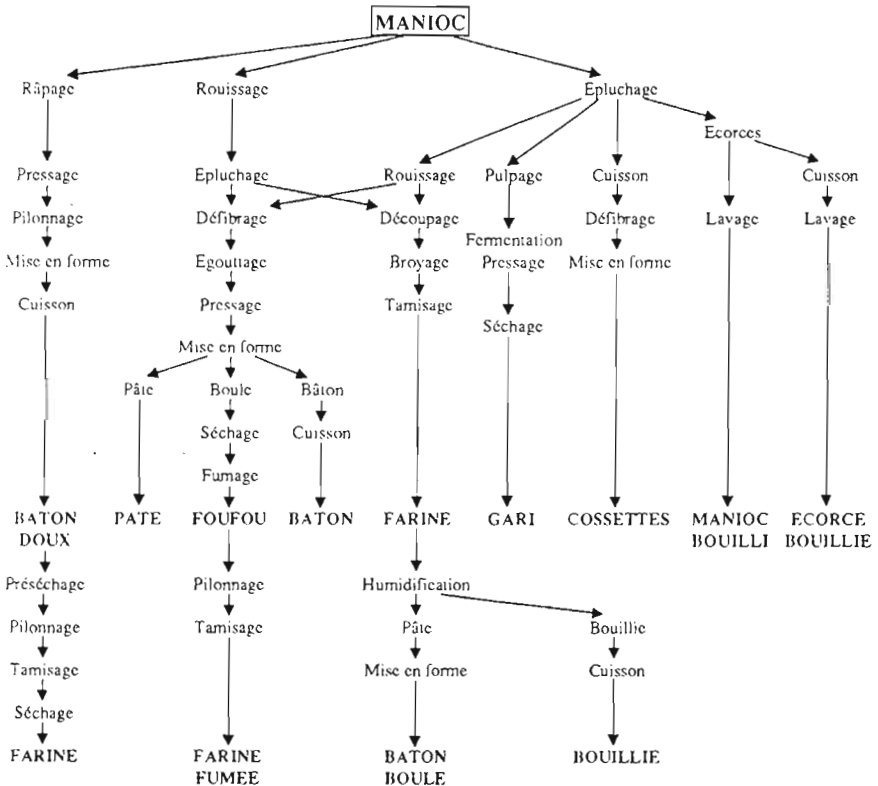


Figure 2.5 : Principales technologies traditionnelles de transformation des racines de manioc pour l'alimentation humaine en Afrique

2.3.2 - Détoxification du gari

La détoxification du manioc, au cours des transformations alimentaires, est effectuée empiriquement. Elle résulte de l'action combinée de différents phénomènes enzymatiques, microbiologiques et physiques. Nous présentons ici, les résultats de quelques travaux relatifs à l'élimination des cyanures lors des différentes opérations de transformation du gari.

L'épluchage

Une importante quantité de cyanures est éliminée lors de l'épluchage (DUFOUR, 1988), les écorces des tubercules contenant 40 à 70% des cyanures totaux (cf. tab. 2.4).

Le râpage

Le râpage des racines détruit la structure des cellules et permet ainsi la mise en contact de la linamarase endogène et des glucosides cyanogéniques. Ces derniers commencent alors à être dégradés pour libérer les cyanohydrines. Ainsi, d'après MADUAGWU et OBEN (1981), la forme "liée" ne représenterait plus que 15 à 20% du cyanure présent dans la pulpe râpée.

Le pressage et la fermentation

La fermentation spontanée qui se produit au cours de ce pressage, résulte de l'action combinée des systèmes enzymatiques endogènes du manioc et de la microflore naturelle présente (CHUZEL et GRIFFON, 1987). Elle entraîne une baisse rapide du pH dans les premières 24 heures. Cette acidification a différentes répercussions sur l'élimination des composés cyanurés :

- une baisse d'activité progressive de la linamarase endogène du manioc (IKEDIABI et ONYIKE, 1982a);

- un ralentissement de la vitesse de dissociation des cyanohydrines en acide cyanhydrique lorsque le pH devient inférieur à 5,5 (COOKE, 1978);

- un déplacement de l'équilibre d'ionisation du cyanure vers sa forme moléculaire HCN (JORY, 1989). Sous cette forme, l'acide cyanhydrique est particulièrement volatil et donc facilement éliminable.

Le pressage, par ailleurs, contribue aussi à diminuer les différentes formes de cyanures par dissolution et élimination dans les jus de presse.

Etude bibliographique

Pour améliorer la détoxification lors de la fermentation, différentes techniques ont été proposées :

- Lavage de la pulpe

MEUSER et SMOLNJK (1980) rapportent que le lavage de la pulpe fermentée permet de diminuer de façon significative les teneurs en cyanure dans le produit final (moins de 10 ppm contre 80 ppm pour une pulpe non lavée). Néanmoins ce le lavage de la pulpe entraîne des pertes importantes de protéines (50%), d'éléments minéraux (40 à 70%) et d'amidon.

- Adjonction de linamarase exogène

IKEDIOBI et ONYIKE (1982a et 1982b) ont étudié l'effet de l'addition de linamarase partiellement purifiée de l'écorce de la racine (IKEDIOBI *et al.*, 1980). Ils observent ainsi que l'addition de linamarase exogène réduit de 87,5% la teneur en cyanure en fin de fermentation contre 50% avec la linamarase endogène seule.

L'utilisation d'enzyme exogène présente donc un intérêt certain. Cependant, elle se heurte aux difficultés d'extraction et de purification qui rendent ce procédé prohibitif. Aussi, IKEDIOBI et ONYIKE (1982b) suggèrent d'inoculer la pulpe de manioc avec une souche microbienne ayant une activité β -glucosidase capable de dégrader la linamarine. Suite à cette étude, plusieurs travaux ont permis l'isolement de microorganismes présentant des activités linamarases (cf. § 2.2.3.2). Cependant, aucun développement de telles applications potentielles n'a encore été réalisé à ce jour.

Cuisson-séchage

Durant cette étape, le manioc est porté à une température de 70 à 80°C proche de la température de gélatinisation de l'amidon. Ce niveau de température élevée favorise l'élimination de l'acide cyanhydrique, mais détruit la linamarase. L'influence de cette opération "cuisson-séchage" sur l'élimination des cyanohydrines et des glucosides cyanogéniques, peu volatils et stables à pH acide, serait donc faible selon COOKE et COCK (1989).

Pour obtenir une détoxification totale du manioc, il est donc nécessaire d'assurer, lors des traitements préalables, la décomposition des glucosides cyanogéniques et la dissociation des cyanohydrines, ce qui malheureusement n'est pas souvent le cas. Ainsi, on peut retrouver dans le gari des teneurs en cyanures totaux résiduels voisines de 15 ppm. Cette moyenne masque une forte dispersion puisque les gari traditionnels rencontrés sur les marchés togolais et béninois par exemple, oscillent entre 10 et 35 ppm de cyanures (CHUZEL et GRIFFON, 1987). D'autre part, les diversités des teneurs résiduelles peuvent résulter du fait que l'étape de fermentation-pressage est plus ou moins longue selon les régions (la durée dépend des flaveurs recherchées).

Ainsi les populations autochtones ingèrent chaque jour entre 5 et 10 mg de cyanures soit 10 à 20% de la dose létale.

Etude bibliographique

2.3.3 - L'étape de fermentation lors de la fabrication du gari

La fermentation est une étape importante qu'il convient d'étudier en détail puisque, au-delà de l'évolution du pH qui influe sur le niveau de détoxification, elle contribue à la conservation et à l'obtention des goûts et des arômes désirés. Notons cependant, qu'elle conduit à des pertes sensibles en protéines et en éléments minéraux (EZEALA, 1984).

Plusieurs études microbiologiques ont été réalisées sur la fermentation naturelle du manioc lors de sa transformation en gari, mais les auteurs sont loin d'être unanimes en ce qui concerne la microflore présente :

- COLLARD et LEVI (1959), ont présenté une théorie qui tentait d'expliquer la détoxification et la fermentation du manioc. Cette théorie fait intervenir deux microorganismes et se déroule en deux étapes :

- . tout d'abord une bactérie, *Corynebacterium manihot*, se développant pendant les deux premiers jours, hydrolyse une fraction de l'amidon en produisant des acides organiques dont l'acide lactique. La baisse de pH qui en résulte, permet une hydrolyse spontanée des glucosides cyanogéniques et la libération d'HCN.

- . dans un deuxième temps, lorsque la quantité d'acides organiques produites est suffisante, les conditions deviennent favorables au développement d'un champignon (*Geotricum candida*). Celui-ci produit une variété d'aldéhydes et de cétones caractéristiques du goût et de l'arôme du gari.

- AKINRELE (1964) observe que durant la fermentation, l'acide lactique est le principal acide organique produit. D'autre part, il démontre l'existence d'une corrélation directe entre le pH final de la pulpe fermentée et la saveur du gari. Ainsi, il apparaît qu'un pH final inférieur à 3,9 est nécessaire pour obtenir un gari de bonne qualité.

- en 1977, OKAFOR remettait en cause les résultats de COLLARD et LEVI (1959). En effet, il n'avait pu isoler qu'une seule fois *Corynebacterium* à partir de différents échantillons et en quantité si faible, qu'il ne pouvait être responsable de la fermentation. Il observe par contre, une prédominance de la flore lactique (*Leuconostoc* sp. principalement et *Lactobacillus* sp.) et la présence en plus faible proportion d'*Alcaligenes* sp. et de levures (*Candida* sp.). Il suppose alors que les résultats obtenus par COLLARD et LEVI (1959) étaient dus à l'utilisation d'un milieu de sélection inapproprié, excluant les bactéries lactiques. D'autre part, il suggère que la dégradation de la linamarine est probablement due à l'activité linamarase endogène plutôt qu'à l'activité de la microflore.

- ABE et LINDSAY (1978) réfutent également les résultats de COLLARD et LEVI. Ils

observent en forte quantité la présence de *Corynebacterium manihot*, mais montrent que cette souche se développe très lentement, et a un pouvoir acidifiant très faible. Pour ces auteurs, le microorganisme prédominant est *Streptococcus faecalis*. Ce dernier produit des composés volatils, en particulier le diacétyl, qui contribuent à l'odeur du produit.

- NGABA et LEE (1979) ont montré que la fermentation de la pulpe de manioc était essentiellement assurée par des bactéries lactiques. Ce sont des espèces de *Lactobacillus*, *L. plantarum* et à un degré moindre, *Streptococcus* qui sont responsables de la production d'acide lactique et du développement du goût caractéristique du manioc fermenté. Des essais d'inoculation massive de la pulpe avec des souches isolées du gari ont été par ailleurs réalisés, et montrent que l'utilisation de *Lactobacillus plantarum* comme starter, permet d'obtenir une baisse plus rapide et importante du pH.

- OKAFOR et EJIOFOR (1986, 1990) isolent de la pulpe de manioc plusieurs microorganismes (*Alcaligenes faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*...) capables de dégrader la linamarine. Ils suggèrent ainsi que la microflore pourrait jouer un rôle également dans l'étape de détoxication du manioc, et que l'inoculation avec une souche présentant une telle capacité permettrait de réduire sa toxicité.

- NWANKWO *et al.* (1989) ont étudié la microflore présente dans la pulpe fermentée de 5 variétés de manioc. Ils ont isolé dans chaque cas, les microorganismes suivants, classés par ordre de prédominance : *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium manihot*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas alcaligenes*.

- OFUYA et NNAJIOFOR (1989) ont évalué l'utilisation de starter pour la production industrielle de gari. Le starter utilisé, constitué d'un cocktail de souches isolées du gari (*Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Saccharomyces* spp.), a permis d'obtenir un produit de bonne qualité tout en réduisant le temps de fermentation à 2 jours. Notons cependant qu'aucune analyse de la teneur en composés cyanurés n'a été effectuée.

- VASCONCELOS *et al.* (1990) ont essayé d'éclaircir le mécanisme de détoxication du manioc durant la fermentation, et en particulier le rôle éventuel de la flore lactique dans ce phénomène. Pour cela, des essais d'inoculation avec *L. plantarum* ont été réalisés. Ils observent que l'hydrolyse des glucosides cyanogéniques est réalisée durant les 3 premières heures de fermentation et qu'elle est le résultat de la linamarase endogène du manioc. Les bactéries lactiques ne seraient donc pas impliquées dans cette étape.

D'autres travaux ont été menés sur la fermentation du manioc, pour d'autres transformations que le gari. Nous citerons :

- CARDENAS et BUCKLE (1980) qui ont étudié la fermentation de l'amidon de

Etude bibliographique

manioc après extraction pour la production de "pan de yuca" (farine fermentée, consommée en Amérique latine). Ils ont montré que les microorganismes prédominants sont des bactéries lactiques (*Lactobacillus plantarum*, seul ou accompagné de *Lactobacillus casei*).

- OYEWOLE et ODUNFA (1990) qui ont isolé et identifié 134 souches de bactéries lactiques au cours des 4 premiers jours d'un rouissage. Les souches appartenaient aux genres *Lactobacillus* (90 % des cas, dont 81 % de *L. plantarum*) et *Leuconostoc* (10 %).

- BRAUMAN *et al.* (1992) qui ont observé, au cours du rouissage du manioc, le développement majoritaire de Streptocoques et *Leuconostoc*, supplantés à partir du troisième jour par *Lactobacillus plantarum*.

Ainsi, malgré la diversité des résultats obtenus, la majorité des auteurs s'accordent aujourd'hui à reconnaître le rôle prédominant des bactéries lactiques dans le processus de fermentation naturelle du manioc. Leur rôle au niveau de la détoxification reste cependant ambigu.

2. 4 - Les bactéries lactiques

2.4.1 - Définition

Il n'existe pas à l'heure actuelle de définition précise et définitive des "bactéries lactiques". On considère cependant comme telles : les bactéries Gram+, non sporulantes, catalase -, aérotolérantes en général, dont le principal produit de fermentation des carbohydrates est l'acide lactique [(D(-), L(+) ou DL)]. On associe également aux bactéries lactiques une idée globale de leurs applications dans les Industries Agro-Alimentaires (LEVEAU et BOUIX, 1980). Cette dernière précision conduit à exclure de ce groupe les espèces bactériennes productrices d'acide lactique mais ayant des conséquences néfastes sur la qualité du produit qui les renferme (Streptocoques fécaux, Staphylocoques...).

La flore lactique ainsi définie constitue un groupe très hétérogène, composé de bactéries appartenant aux genres suivants : *Streptococcus* (récemment renommé *Lactococcus*), *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

Dans le cas de notre étude, nous ne traiterons pas du genre *Bifidobacterium*, qui présente certaines particularités : voie de fermentation des carbohydrates spécifique, pas de relation phylogénique avec les autres genres, et absence dans la microflore épiphyte des aliments fermentés (KANDLER, 1983).

2.4.2 - Métabolisme énergétique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de chaîne respiratoire (absence de cytochromes). L'énergie disponible pour la croissance dépend ainsi principalement de la phosphorylation des produits intermédiaires provenant du catabolisme des sucres. Un surplus d'énergie peut également être généré par des mécanismes d'excrétion du lactate.

2.4.2.1 - Métabolisme énergétique lié à la dégradation des sucres

Chez les bactéries lactiques, il existe deux voies de dégradation du glucose, présentées sur la figure 2.6 :

- Voie d'Embden-Meyerhof-Parnas : voie homofermentaire dans laquelle l'acide lactique est le seul produit du métabolisme excrété à partir du glucose.
- Voie des pentose-phosphates : voie hétérofermentaire, conduisant à l'acide lactique en mélange avec d'autres produits d'excrétion : CO_2 , acide acétique, éthanol... selon les microorganismes considérés.

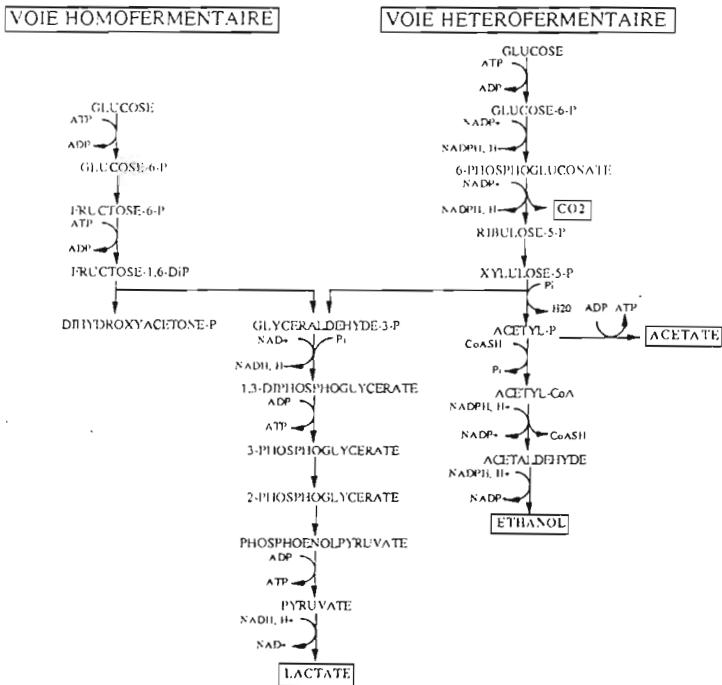
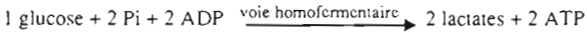


Figure 2.6 : Voies métaboliques du glucose chez les bactéries lactiques (d'après COGAN, 1980)

Les bactéries homolactiques sont représentées par les *Lactococcus*, les *Pediococcus* et certaines espèces de *Lactobacillus* ; les bactéries hétérolactiques sont représentées par les *Leuconostoc* et certaines espèces de *Lactobacillus*. Il convient toutefois de noter que dans certaines conditions, le métabolisme d'une souche réputée homofermentaire peut devenir de type hétérofermentaire (RHEE et PACK, 1980 ; MURPHY *et al.*, 1985 ; BORCH *et al.*, 1991).

Le bilan énergétique des différentes voies est le suivant :



Selon la voie métabolique suivie, la dégradation d'une molécule de glucose ne permet la synthèse que d'une ou deux molécules d'ATP, alors que la voie oxydative telle que la respiration de l'oxygène, fournit 36 molécules d'ATP par mole de glucose dégradé. L'énergie libre directement disponible fournie lors de la fermentation lactique est donc relativement faible, ce qui entraîne des rendements biomasse/substrat faibles.

2.4.2.2 - Métabolisme énergétique lié à l'excrétion de lactate

Il a été observé chez *S. cremoris* (OTTO *et al.*, 1980, 1982) que l'excrétion du lactate réalisée en symport avec des protons contribue à l'existence d'un potentiel membranaire dont la valeur est liée au mode de culture. Ce potentiel membranaire peut alors être converti en énergie chimique pour la synthèse d'ATP ou en énergie électrochimique pour le transport d'ions ou de substrats. Chez *S. lactis*, MALONEY (1977) et MALONEY et HANSEN (1982) ont pu mettre ainsi en évidence un couplage entre l'entrée de protons dans la cellule et la synthèse d'ATP (2 H⁺/ATP) catalysé par une ATPase membranaire.

La stœchiométrie d'excrétion H⁺/lactate déterminant la valeur du potentiel membranaire, peut varier de 0.9 à 2 suivant les conditions de culture (BRINK et KONINGS, 1982). Dans le cas où cette stœchiométrie est de 2, la valeur du potentiel membranaire est suffisante pour permettre la synthèse d'une mole d'ATP supplémentaire par mole de glucose consommé, ce qui représente un gain d'énergie libre de 50% pour les bactéries homolactiques.

Les résultats obtenus au cours de ces différents travaux sont en accord avec le modèle de recyclage d'énergie postulé par MICHELS *et al.*(1979). La figure 2.7 schématise les voies génératrices et consommatrices d'énergie chez les Streptocoques.

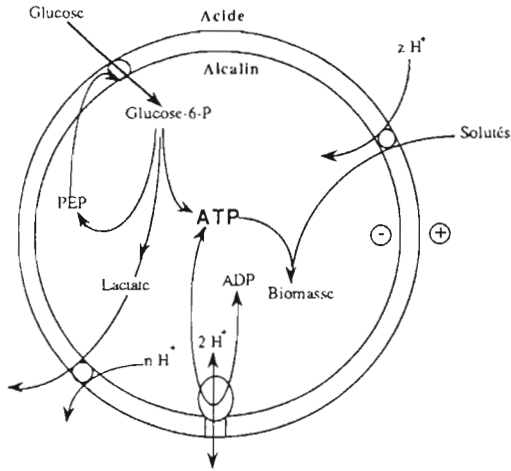


Figure 2.7 : Procédés générateurs et consommateurs d'énergie chez les Streptocoques (d'après KONINGS et OTTO, 1983).

2.4.3 - Exigences nutritionnelles

Les bactéries lactiques constituent un groupe de microorganismes particulièrement exigeants. En effet, outre la présence d'un sucre fermentescible, elles ont également besoin pour se développer, de plusieurs acides aminés, vitamines et d'un système tampon capable de neutraliser les quantités élevées d'acides produites pendant la croissance. Ces différents éléments ne peuvent être fournis que par des milieux très complexes. Le milieu MRS (DE MAN *et al.*, 1960) qui contient 20 g de glucose et près de 25 g de sources protéiques complexes (sous la forme d'extrait de viande, extrait de levure et d'hydrolysate de caséine), est un milieu qui permet la croissance de l'ensemble des bactéries lactiques (REUTER, 1985).

Compte tenu du rôle essentiel joué par les systèmes protéolytiques pour la production de petits peptides et acides aminés nécessaires à la croissance, de nombreuses études visant à mieux connaître les systèmes enzymatiques (peptide hydrolases, aminopeptidases et protéases) des bactéries lactiques, ont été réalisées (LAW et KOLSTAD, 1983 ; THOMAS et PRITCHARD, 1987).

Les acides aminés pénètrent dans la cellule par transport actif. La vitesse de transport est souvent liée à la valeur du potentiel membranaire (KONINGS et OTTO, 1983) ; elle varie suivant

la nature et le pH du milieu de culture (POOLMAN *et al.*, 1987).

Concernant la croissance des lactobacilles, la leucine, la valine, l'acide glutamique, l'arginine, la tyrosine et le tryptophane sont cités comme étant indispensables (LEDESMA *et al.*, 1977). Mentionnons également que les streptocoques exigent au moins six acides aminés : la leucine, l'isoleucine, la valine, l'acide glutamique, la méthionine et l'histidine (COGAN, 1980).

En ce qui concerne les exigences en vitamines, celles-ci sont propres à chaque espèce ; le pantothénate et la niacine sont nécessaires pour assurer une bonne croissance des lactobacilles (LEDESMA *et al.*, 1977) alors que les streptocoques exigent de la niacine et de la riboflavine (REITER et ORAM, 1962).

La présence d'oligoéléments dans le milieu de culture permet d'activer la multiplication cellulaire des bactéries lactiques. Dans le cas des lactobacilles, des quantités non négligeables de Mn^{2+} et Fe^{2+} sont indispensables à leur croissance (LEDESMA *et al.*, 1977).

2.4.4 - Rôles des bactéries lactiques dans les fermentations traditionnelles

Les bactéries lactiques sont, avec les levures, les microorganismes les plus utilisés par l'homme. Leur application rend en effet possible la fabrication de milliers d'aliments fermentés, souvent en cultures mixtes avec d'autres bactéries, levures et moisissures. Le tableau 2.9 donne quelques exemples d'utilisation de bactéries lactiques dans la préparation de certains produits. Nous pouvons observer qu'elles interviennent dans la préparation d'aliments très variés à base de céréales, légumes, viandes, lait, etc.

L'industrie laitière est la première utilisatrice de ces microorganismes ; les produits laitiers représentent près de 20% de la valeur économique totale des aliments fermentés à travers le monde (SHARPE, 1979). Cet enjeu économique explique que la plupart des travaux ont été principalement focalisés sur la physiologie des bactéries lactiques directement impliquées dans l'industrie laitière (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*...).

Dans tous ces procédés de transformation traditionnels, l'influence des bactéries lactiques est double. Leur développement permet en effet :

- d'augmenter la durée de conservation des aliments qu'elles fermentent,
- de contribuer au développement des qualités organoleptiques.

Tableau 2.9 : Exemples d'utilisation de bactéries lactiques dans certains produits (d'après BRINK et HUTS INT' VELD, 1991)

Produit	Bactérie(s) lactique(s) utilisée(s)
Fromage	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Leuconostoc</i> ssp. <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus casei</i>
Yaourt	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
Charcuterie	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pediococcus acidilactici</i>
Vin	<i>Leuconostoc oenos</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
Choucroute	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
Pain au levain	<i>Lactobacillus sanfrancisco</i> <i>Lactobacillus brevis</i>
Sauce de soja	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Pediococcus soyae</i>
Légumes macérés au vinaigre	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
Probiotique	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i>
Ensilage	<i>Lactobacillus plantarum</i>

2.4.4.1 - Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques peuvent aussi exercer une activité inhibitrice sur le développement de microorganismes indésirables et pathogènes grâce à la production d'acides organiques (l'acide lactique en particulier), de peroxyde d'hydrogène ou d'inhibiteurs spécifiques (bactériocines).

Effet de l'acidification

Les acides lactique et acétique, produits lors de la fermentation dans les aliments, inhibent la croissance de certains microorganismes par l'abaissement de pH qui résulte de leur production mais aussi par une action inhibitrice spécifique de ces acides.

Etude bibliographique

Dans les produits fermentés, la chute du pH dépend de la concentration en substrats fermentescibles. Elle est limitée par le pouvoir tampon du milieu et par le pH minimum toléré par les ferments lactiques présents. Le pH atteint dans certains de ces produits (yaourt, pH 4,0; manioc fermenté, pH 3,8; choucroute, pH 4,8) suffit à éliminer la plupart des contaminants.

L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme non dissociée. Cette forme pénètre librement dans la cellule où elle s'ionise, ce qui provoque un abaissement du pH interne et le blocage de certains mécanismes de transport (CORLETT et BROWN, 1980) cité par BELIARD et THUAULT (1989).

Dans le cas de l'acide lactique, les concentrations en acide non dissocié nécessaire pour provoquer une inhibition, seraient pour les levures, les *Enterobacteriaceae* et les *Micrococcaceae* de l'ordre de 1 mM, de 2 mM pour les moisissures et de 3mM pour les *Bacillaceae* (BAIRD PARKER, 1980, cité par BELIARD et THUAULT, 1989).

Inhibition due au peroxyde d'hydrogène

En présence d'oxygène, les bactéries lactiques ont la capacité d'oxyder certaines molécules (pyruvate, lactate, NADH, H⁺), en libérant de l'H₂O₂ (DAESCHEL, 1989). L'absence de catalase chez la plupart de ces microorganismes peut entraîner une accumulation de peroxyde d'hydrogène dans le milieu de culture qui résulte d'un déséquilibre entre les moyens de synthèse et de dégradation de ce composé toxique. Cette accumulation provoque l'inhibition de nombreux microorganismes pathogènes (Salmonelles, Pseudomonas, Staphylocoques...), mais aussi des phénomènes d'auto-inhibition de la flore lactique (BELIARD et THUAULT, 1989).

Inhibition due à des bactériocines

De nombreuses espèces de bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont capables de produire des bactériocines. Ce sont des inhibiteurs de nature protéique (au moins en partie), ayant une activité bactéricide pour des espèces proches en général de l'espèce productrice, voire des souches de la même espèce (TAGG *et al.*, 1976). Cependant, certaines espèces produisent des inhibiteurs ayant un spectre d'action plus large, incluant des germes pathogènes (cf. tab. 2.10). Nous citerons pour exemple, la nisine (famille de polypeptides), produite par des souches de *Lactococcus lactis*, qui a un effet inhibiteur sur des souches de *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*... Elle est employée comme agent de conservation dans l'industrie alimentaire.

Tableau 2.10 : Bactéries lactiques ayant un effet inhibiteur sur des germes pathogènes (d'après BELIARD *et al.*, 1991)

Microorganismes inhibiteurs	Microorganismes inhibés
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lactobacillus sake</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Clostridium</i> <i>Listeria</i> <i>Bacillaceae</i>

2.4.4.2 - Développement des qualités organoleptiques dans les aliments

Le métabolisme des carbohydrates, des protéines et, à un degré moindre des lipides par les bactéries lactiques, entraîne durant la fermentation, des changements dans la texture, l'arôme et la saveur des aliments. Nous citerons quelques exemples du rôle joué par les bactéries lactiques dans le développement des qualités organoleptiques de certains aliments.

L'acide lactique, qui est le principal produit formé par le métabolisme des sucres, est responsable du goût frais acide de nombreux aliments (choucroute, gari, amidon aigre...).

Le métabolisme du citrate par certaines bactéries lactiques (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* et *Leuconostoc* sp.) conduit à la formation de molécules aromatiques (acétoïne, diacétyl, 2-3 butanediol) (DIVIES, 1991). Le diacétyl est le principal agent responsable de l'odeur du bon beurre et de nombreux produits laitiers fermentés.

Le CO₂, produit également par le métabolisme du citrate, est le gaz responsable de la formation des yeux caractéristiques de certains fromages.

La fermentation malolactique du vin réalisée principalement par *Leuconostoc oenos*, au cours de laquelle l'acide malique est transformé en acide lactique et en CO₂, permet de réduire l'acidité et ainsi d'améliorer le goût du vin (LONVAUD-FUNEL, 1991).

Le métabolisme des protéines dans les fromages est fondamental, car il va participer à la formation du goût et des arômes. La protéolyse réalisée par les bactéries lactiques, va essentiellement conduire à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux arômes. En effet, la méthionine peut conduire à des composés soufrés caractéristiques ; la phénylalanine et la tyrosine à des composés volatils à noyau aromatique ; la sérine à de l'ammoniaque, etc, ceci après leur dégradation par les flores d'affinages (HEMME *et al.*, 1982).

Il apparaît ainsi, que les bactéries lactiques possèdent des propriétés métaboliques particulièrement intéressantes. Ceci explique le succès de leur utilisation comme starter dans l'industrie agro-alimentaire et plus particulièrement dans l'industrie laitière.

Des études complémentaires, en vue d'acquérir une meilleure connaissance de leur physiologie ou de caractériser de nouvelles souches, permettront de découvrir de nouvelles propriétés et de développer ainsi de nouveaux starters ayant des performances supérieures. D'autre part, les progrès réalisés au cours de ces dix dernières années dans le domaine du génie génétique, permettront sans doute dans le futur, la construction de nouvelles souches de bactéries lactiques, équipées d'une panoplie de propriétés métaboliques bénéfiques, propriétés pouvant même provenir d'autres genres de bactéries.

2.5 - Conclusion

L'étude bibliographique a permis de dégager les principaux points suivants :

- Le manioc est une plante à fort potentiel énergétique

L'intérêt de l'utilisation du manioc peut paraître ambigu. En effet, il présente de nombreux défauts : plante rapidement périssable après la récolte, aliment pauvre en raison de ses faibles teneurs en protéines et vitamines, aliment toxique pouvant entraîner à long terme des maladies chroniques. Cependant, il présente aussi de nombreux mérites : plante capable de pousser sur des sols pauvres, susceptible de fournir des productions régulières avec un minimum de travail, aliment très énergétique et dont l'amidon présente une haute digestibilité. Le besoin sans cesse croissant en sources énergétiques, des populations des pays en voie de développement, justifie amplement que l'on s'intéresse, malgré ses quelques faiblesses, à développer son utilisation.

- Il faut améliorer le processus de détoxication du manioc

Le manioc contient des glucosides cyanogéniques (linamarine principalement) qui peuvent être dégradés enzymatiquement par une linamarase endogène, en HCN avec la formation d'un composé intermédiaire, l'acétone cyanohydrine. Il convient d'éliminer ces différents composés toxiques pour l'obtention d'aliments sains. Pour cela, les populations autochtones ont su développer toute une série de transformations traditionnelles.

Dans le cas du gari, deux étapes apparaissent essentielles pour permettre la détoxication du manioc : l'opération de râpage qui permet la mise en contact de l'enzyme et de son substrat, l'opération de cuisson qui permet la volatilisation de l'HCN. Il semblerait que la quantité d'enzyme libérée soit insuffisante pour dégrader la totalité de la linamarine. Il conviendrait donc d'améliorer, pour diminuer la toxicité du manioc, les performances d'hydrolyse des glucosides cyanogéniques durant la fermentation.

- Les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans le processus de fermentation du manioc

La fermentation apparaît comme une étape clé dans l'obtention des caractéristiques organoleptiques des aliments à base de manioc. Elle se déroule naturellement grâce au développement de la microflore épiphyte. Les microorganismes intervenant au cours de cette fermentation, sont essentiellement les bactéries lactiques. Nous avons souligné l'intérêt de ces bactéries dans les transformations traditionnelles en général. Elles interviennent en effet dans le développement des caractéristiques organoleptiques mais aussi dans la conservation des aliments.

La maîtrise du processus de fermentation du manioc devrait permettre d'obtenir les goûts et arômes désirés et d'éviter toute contamination éventuelle. L'utilisation de starters de bactéries lactiques présentant des propriétés métaboliques et physiologiques particulières pourrait permettre d'atteindre cet objectif.

C'est sur la base de ces trois considérations essentielles que le travail présenté en introduction a été réalisé.

MATERIEL ET METHODES

3.1 - Microorganismes

Lors de cette étude, nous avons utilisé des souches appartenant uniquement au groupe des bactéries lactiques (cf. tab. 3.1). Ces souches ont diverses origines : elles proviennent de collections internationales ou nationales, certaines ont été isolées du manioc fermenté au centre de ORSTOM de Brazzaville, d'autres nous ont été offertes.

Tableau 3.1 : bactéries lactiques étudiées

Souche	Origine
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lactolabo, Dange, Saint Romain
<i>Lactobacillus plantarum</i> A6	Isolée du manioc roui (ORSTOM Brazzaville)
<i>Lactobacillus plantarum</i> A43	Isolée du manioc roui (ORSTOM Brazzaville)
<i>Lactobacillus brevis</i>	CNCM 102806
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	CNCM 102988T
<i>Lactobacillus sake</i>	Isolée du manioc roui (ORSTOM Brazzaville)
<i>Streptococcus equinus</i>	CNCM 103233
<i>Streptococcus lactis</i>	CNRZ 145
<i>Streptococcus cremoris</i>	CNRZ 111
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	INRA 20G
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i>	CNCM 103009
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	INRA 18G
<i>Pediococcus damnosus</i>	DSM 20311
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CNCM 102260

Différentes techniques de conservation de ces souches ont été utilisées :

- conservation sur boîte de Pétri sur milieu M.R.S. (Difco) à 4°C. La souche peut être conservée dans ces conditions pendant 1 à 3 semaines.

- conservation en glycérol à -80°C. Après croissance en milieu liquide MRS pendant 24 h, la culture est reprise avec 50% de glycérol, distribuée stérilement en tube de Nunc de 1ml et conservée à - 80°C. La souche peut être conservée plusieurs mois dans ces conditions.

- conservation par lyophilisation. Après croissance en milieu liquide MRS pendant 24 h, la culture est reprise avec 50% d'une solution contenant 1% de lait écrémé Difco et 0,5% de glutamate de sodium. La souche est alors lyophilisée en ampoule de 5 ml puis conservée à 4°C. Dans ces conditions, la conservation peut durer plusieurs années.

Matériel et Méthodes

3.2 - Milieux de culture

Le milieu de culture généralement utilisé pour l'ensemble des expériences est le milieu MRS (DE MAN *et al.*, 1960) dont la composition de base est détaillée ci-dessous.

Selon les expériences, la source de carbohydrate (glucose) est remplacée par du cellobiose, de l'amidon soluble (Prolabo, ref. 21 152.291) ou différents substrats carbonés, la concentration est également variable et peut atteindre dans certains cas, 50 g/l.

Les milieux sont autoclavés 20 min à 121°C.

composition du milieu MRS-Glucose (liquide) :

Pour 1 litre d'eau distillée:

Peptone pancréatique de caséine	10 g
Extraits de viande	10 g
Extraits de levure	5 g
Glucose	20 g
Hydrogénocitrate de diammonium	2,17 g
Acétate de sodium	5 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,207 g
Sulfate de manganèse monohydraté	0,056 g
Hydrogénophosphate de dipotassium	2,62 g
pH final à 25°C : 6,5	

Ce milieu de culture est commercialisé par les laboratoires DIFCO (ref. 0881-01-3). Le milieu MRS-Glucose gélosé est reconstitué à partir du milieu liquide, auquel on ajoute de l'Agar-Agar à 15 g/l.

Un autre milieu a été utilisé pour la sélection des souches amylolytiques : le milieu JP2 dont la composition est donnée ci-dessous.

composition du milieu JP2 :

Pour 1 litre d'eau distillée:

Peptone pancréatique de caséine	2,5 g
Peptone de soja	5 g
Peptone universelle M66	2,5 g
Extraits de levure	5 g
Extraits de viande	2,5 g
Amidon soluble (Prolabo)	3 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,1 g
Sulfate d'ammonium	2 g
Hydrogénophosphate de dipotassium	0,2 g
Chlorure de sodium	3 g
pH final à 25°C : 6,75	

3.3 - Conditions de culture

3.3.1 - Culture en Erlenmeyer

Les souches sont cultivées pendant 20 heures à 30°C (sans agitation) en Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu MRS. L'ensemencement s'effectue à partir d'un tube de Nunc.

3.3.2 - Culture en bioréacteur

Les croissances ont été réalisées en batch. Les réacteurs utilisés sont de type Biolaffite (Poissy, France). Ces cuves autoclavables présentent une double enveloppe permettant de réguler la température, par circulation d'eau. Leur volume utile est d'environ 1,5 l (volume total 2,2 l). Les réacteurs sont équipés d'une sonde à pH Ingold autoclavable, d'une sonde à température et d'un système d'agitation.

La conduite du réacteur est réalisée à partir d'un boîtier de commandes qui permet le contrôle et la régulation de l'agitation, de la température et du pH.

- Conditions de culture :

- Agitation fixée à 150 tpm
- Température régulée à 30°C
- pH régulé à 6,0 par addition de NaOH 5 N
- Aucune aération n'a été apportée.

Le milieu de culture, autoclavé dans le réacteur 30 min à 121°C, a étéensemencé à 10% (v/v) avec une préculture de 20 heures à 30°C, réalisée en Erlenmeyer dans un milieu de composition identique. Des prélèvements ont été effectués à intervalles de temps réguliers. Ils permettent de suivre l'évolution de la biomasse, la production d'acide lactique, la consommation de sucres et la production d'enzymes (linamarase et amylase).

Expression des résultats

Les rendements biomasse/substrat ($Y_{x/s}$ en g/g), lactate produit/substrat ($Y_{p/s}$ en g/g) et le taux de croissance (μ en h^{-1}), sont obtenus en calculant respectivement les coefficients de régression linéaire de la biomasse en fonction du substrat résiduel, de l'acide lactique en fonction du substrat résiduel, et du Ln DO en fonction du temps, uniquement lors de la phase exponentielle de croissance. Les différents coefficients sont calculés avec un intervalle de confiance de 0.95. Le

Matériel et Méthodes

rendement Y_{ATP} (g de biomasse/mole d'ATP) est calculé en considérant que de 2 moles d'ATP sont produites par mole de glucose dégradée lors d'une fermentation homolactique.

3.4 - Estimation de la population bactérienne

- Par néphélométrie

Cette méthode a été utilisée pour suivre les croissances en fermenteur et en Erlenmeyer. L'absorbance des suspensions cellulaires a été mesurée à 540 nm avec un spectrophotomètre Milton Roy Spectronic 401. Des dilutions de la suspension cellulaire sont effectuées afin de se situer dans la zone de validité de lecture de la densité optique comprise entre 0.1 et 0.5.

- Par dénombrement sur boîte de Pétri

Cette méthode a été utilisée pour estimer la population bactérienne au cours de la fermentation du manioc. L'échantillon à analyser (10 g) a été homogénéisé avec 90 ml d'eau physiologique stérile. Une gamme de dilutions décimales a été ensuite réalisée à partir de la suspension précédemment obtenue. Les boîtes de Pétri contenant du milieu MRS-Glucose gélosé, ont été ensemencées en surface avec 0,1 ml des différentes dilutions. Trois boîtes de Pétri ont été ensemencées avec chaque dilution. Le résultat correspond à la moyenne des nombres de colonies comptées sur les boîtes (entre 30 et 300 colonies).

- Par détermination de la matière sèche

Un volume de 10 ml de la suspension cellulaire est centrifugé à 10000 g pendant 10 min dans des tubes à essai préalablement tarés. Les cellules sont lavées à l'eau distillée et séchées à l'étuve à 105°C pendant 24 h. La matière sèche est mesurée par différence de pesée et évaluée sur 3 essais.

3.5 - Techniques des dosages biochimiques

3.5.1 - Dosages colorimétriques des sucres

3.5.1.1 Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont dosés selon la méthode de DUBOIS *et al.* (1956). Une hydrolyse des polysaccharides est réalisée en milieu acide à chaud. L'antrone réagit avec les hexoses et les aldopentoses pour donner un complexe de couleur bleu-vert, présentant un maximum d'absorbance

Matériel et Méthodes

à 625 nm. La présence de protéines contenant du tryptophane donne une couleur rouge à l'échantillon et peut interférer avec la réaction.

Cette méthode très sensible, permet de doser des concentrations en sucres totaux allant de 0 à 50 mg/l. Compte tenu de la très grande sensibilité de la méthode, il est nécessaire d'effectuer des dilutions souvent très importantes de l'échantillon à doser. De plus, les tubes utilisés doivent être d'une extrême propreté et exempts de toutes traces de poussière. Il est ainsi recommandé de laisser tremper les tubes à essai pendant une nuit dans de l'acide sulfurique dilué puis de les rincer et sécher soigneusement.

Le réactif est préparé en dissolvant 200 mg d'anthrone dans 100 ml d'acide sulfurique pur. A 2,5 ml d'échantillon préalablement dilué, on ajoute 5 ml de réactif à l'anthrone. Les tubes sont agités au vortex et portés à ébullition pendant 10 min. La réaction est stoppée par refroidissement en plaçant les tubes dans un bain de glace. L'absorbance est lue à 625 nm. Une gamme étalon de glucose allant de 0 à 50 mg/l est réalisée en parallèle pour chaque série de mesures.

3.5.1.2 - Dosage des sucres réducteurs

Les sucres réducteurs sont dosés selon la méthode de MILLER (1959). A température élevée et en milieu basique, l'acide 3,5-dinitrosalicylique est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique en présence de sucres réducteurs. Le produit de la réaction est jaune-orangé, et possède un maximum d'absorption à 575 nm. Cette méthode permet de doser des concentrations en sucres réducteurs allant de 0 à 1 g/l. La présence de fortes concentrations en protéines peut interférer sur la lecture.

La composition du réactif DNS est la suivante (g/l) : acide 3,5-dinitrosalicylique, 10,0 ; hydroxyde de sodium, 10,0 ; sulfite de sodium, 0,5 ; phénol, 2.

A 1 ml de l'échantillon convenablement dilué, on ajoute 1 ml du réactif DNS. Le mélange est porté à ébullition 5 min et refroidi rapidement en le plongeant dans un bain de glace. Après addition de 8 ml d'eau distillée, le contenu des tubes est homogénéisé au vortex et la densité optique est lue à 575 nm. Une gamme étalon de glucose allant de 0 à 1 g/l est réalisée en parallèle pour chaque série de mesures.

3.5.1.3 - Dosage de l'amidon

L'amidon est dosé selon 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 g/l : KI, 30 ; I₂, 3. 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 (Prolabo) allant de 0 à 10 g/l est réalisée en parallèle pour chaque série de mesures.

3.5.2 - Dosage des acides organiques et des sucres par HPLC

La séparation de ces différentes molécules a pu être réalisée grâce à l'utilisation d'une colonne à base de résine (colonne Aminex HPX87H / Biorad Co).

Cette colonne permet la séparation des acides organiques, des sucres simples ou complexes et des différents alcools, grâce aux actions combinées de mécanismes d'échanges d'ions, de tamisage moléculaire et d'interactions hydrophobes. La résine est un copolymère de styrène et de sulfonate de divinyl benzène (cf. figure 3.1). La charge sur la résine assure les interactions ioniques alors que le squelette de polystyrène favorise les interactions de type hydrophobe. L'action combinée de ces multiples systèmes d'interactions permet ainsi la séparation d'un très grand nombre de molécules par rapport aux colonnes classiques à base de silice, qui ne font intervenir qu'un seul principe d'interaction.

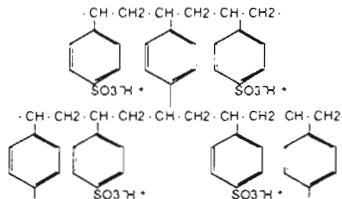


Figure 3.1 : Groupements greffés sur la colonne Aminex HPX87H Biorad

Deux détecteurs sont branchés en série en sortie de colonne : un réfractomètre pour détecter les sucres, les alcools et les acides organiques et un détecteur UV à 210 nm pour les acides organiques et autres molécules. L'analyse par réfractométrie a un seuil de détection assez faible mais permet un dosage précis pour des concentrations supérieures à 0,3 g/l.

Le tableau 3.2 présente la liste des composants quantifiés par cette méthode ainsi que leur temps de rétention.

* *Caractéristiques du dispositif HPLC :*

Pompe : LDC 3200 Consta Metric
 Vanne d'injection : vanne rhéodyne 7125 munie d'une boucle d'injection de 20 µl
 Colonne: Aminex HPX87H (BIORAD)
 Four : Jones
 Détecteurs : Réfractomètre PHILIPS PU 4026, spectrophotomètre LDC 3100
 Intégrateur : Logiciel Chroma commercialisé par la société Biosystème

* *Conditions de chromatographie :*

Eluant: H₂SO₄ 6 mM, dégazé sous hélium
 Température : 65°C
 Débit : 0,8 ml/min

Tableau 3.2 : composés quantifiés par HPLC

Composant	Temps de rétention (min)
Cellobiose	5,7
Maltose	5,7
Glucose	6,8
Linamarine	7,1
Acide lactique	9,67
Acide acétique	11,35
Acétone cyanohydrine	12,5
Acide propionique	13,3
Acide isobutyrique	14,88
Méthanol	14,89
Acide butyrique	16,1
Ethanol	17
Acide isovalérique	18,42
Acide valérique	21,74

3.5.3 - Dosage des protéines

Les protéines totales ont été dosées dans les extraits enzymatiques obtenus au cours des différentes étapes de purification de l'amylase de *L. plantarum* A6. Nous avons utilisé le kit *Protein Assay* (Biorad, ref. 500311). Cette méthode simple (un seul réactif), et rapide (5 min), est très sensible (seuil de détection : 10 µg/ml). Il s'agit d'une technique basée sur la méthode de BRADFORD (1976).

3.6 - Dosages des différentes formes de cyanures

Principe et méthode :

Dans le manioc, les cyanures peuvent se trouver sous différentes formes :

- les cyanures libres, parmi lesquels on distingue les ions CN^- et les cyanohydrines (acétone cyanohydrine principalement)
- les cyanures liés ou glucosides cyanogéniques (linamarine principalement).

La linamarase (β -glucosidase) hydrolyse la linamarine en glucose et acétone cyanohydrine. En milieu basique, l'acétone cyanohydrine se dissocie réversiblement en acétone et CN^- , l'équilibre se situant à pH 5,5. Par contre, pour des pH basiques de l'ordre de 11 à 13, cette dissociation est totale et irréversible.

La linamarase endogène du manioc, libérée lors du broyage, agit très rapidement sur la linamarine. Pour mesurer les différentes teneurs en cyanures dans le manioc, il est donc nécessaire d'inhiber cette activité. Ceci est réalisé en diluant l'échantillon à 50% dans de l'acide sulfurique 0.1 N. L'échantillon est ensuite broyé finement à l'Ultra-Turrax. Ce broyage doit être effectué dans la glace pour éviter la volatilisation des ions CN^- . Les dosages sont ensuite effectués sur le surnageant du broyat, obtenu après centrifugation. Ce même surnageant peut être utilisé pour déterminer les teneurs des différents acides organiques par HPLC.

Les ions cyanures libérés lors de cette réaction sont très volatils, aussi ces dosages seront effectués en tube Eppendorf bouché. Les cyanures sont dosés à l'aide d'un Kit colorimétrique Spectroquant (Merck ref. 14800) dans un volume de 5 ml et à un pH proche de 5-6. Voir le schéma récapitulatif (figure 3.2).

Dilution et neutralisation de l'échantillon : à 400 μl de surnageant d'un broyat de manioc fermenté (conservé dans la glace), on rajoute 100 μl de NaOH 0.2 N et 3.5 ml de tampon phosphate 0.1 M ; pH 6, de façon à rétablir un pH proche de la neutralité (volume total 4 ml, le facteur de dilution (D1) au cours de cette étape est de 10). C'est à partir de cet échantillon (E), que sont réalisés les 3 dosages suivants :

Dosage des ions CN^-

Suivant la quantité d'ions CN^- attendue, les cyanures sont dosés avec le kit Spectroquant sur une prise d'essai variant de 100 à 500 μl de l'échantillon E à laquelle on rajoute 4,9 à 4,5 ml d'eau distillée. Le facteur de dilution (D2) est donc de 10 à 50.

Dosage des cyanures libres

Il consiste à doser l'ensemble des molécules CN^- et acétone cyanohydrine. Pour cela, à 500 μl de l'échantillon (E), on ajoute 500 μl de NaOH 0,2 N. Ceci a pour effet d'élever le pH à 13 et d'entraîner la dissociation complète et irréversible de l'acétone cyanohydrine en une quantité équivalente d'ions cyanures, dosables par le kit. Le pH est ensuite ramené à 5 (pH requis pour le kit) par addition de 4 ml d' H_2SO_4 0,025 N (volume total 5 ml soit un facteur de dilution $\text{D}_2=10$). Les cyanures libres sont dosés à l'aide du kit Spectroquant. Par différence (cyanures libres moins ions CN^-), on obtient la teneur en acétone cyanohydrine.

Dosage des cyanures totaux

Il consiste à doser l'ensemble des cyanures libres et liés (linamarine). Le principe est similaire au dosage des cyanures libres mais avec une étape préliminaire supplémentaire au cours de laquelle la linamarine est hydrolysée pour produire une quantité équivalente d'acétone cyanohydrine. Cette hydrolyse est réalisée à l'aide d'un culot de *L. plantarum* A6, souche sélectionnée pour son importante activité linamarase. L'utilisation d'un tel procédé constitue une originalité par rapport aux méthodes généralement citées dans la littérature (COOKE, 1978 ; RAO et HAHN, 1984), dans lesquelles l'hydrolyse de la linamarine est réalisée à l'aide de linamarase purifiée du manioc. A 3 ml de l'échantillon (E), on ajoute 1ml de suspension cellulaire de *L. plantarum* A6 (soit une dilution $\text{D}_3=1.33$). L'ensemble est incubé en tube fermé hermétiquement environ 30 min à 30°C, pour permettre l'hydrolyse totale de la linamarine. 500 μl sont ensuite prélevés et subissent le même traitement que celui décrit pour le dosage des cyanures libres (ici, $\text{D}_2=10$). Par différence (cyanures totaux moins cyanures libres), on obtient la teneur en linamarine.

Calculs :

D : le produit des dilutions successives réalisées (D1, D2 et D3 le cas échéant)

P : le % de poids sec dans le broyat, mesuré après ajout d'acide sulfurique

A : Pente de la droite d'étalonnage des ions CN^- exprimée en $\mu\text{mol/l}$ de CN^- par unité de DO à 585 nm

Masse molaire du cyanure = 26 g

On a alors : Teneur (équivalent en ppm de CN^-) = $\text{DO } 585 \text{ nm} \times \text{A} \times \text{D} \times 100/\text{P} \times 26$

Préparation d'une suspension cellulaire de L. plantarum A6 : un litre de culture, obtenu en fermenteur sur milieu MRS-Cellobiose, est centrifugé (20 min à 4500 rpm) en fin de phase de croissance. Le culot est lavé 2 fois dans du tampon phosphate 50 mM, pH 6 puis remis en suspension dans 1 litre du même tampon contenant du glycérol à 20%. La suspension cellulaire est répartie et conservée à -30°C.

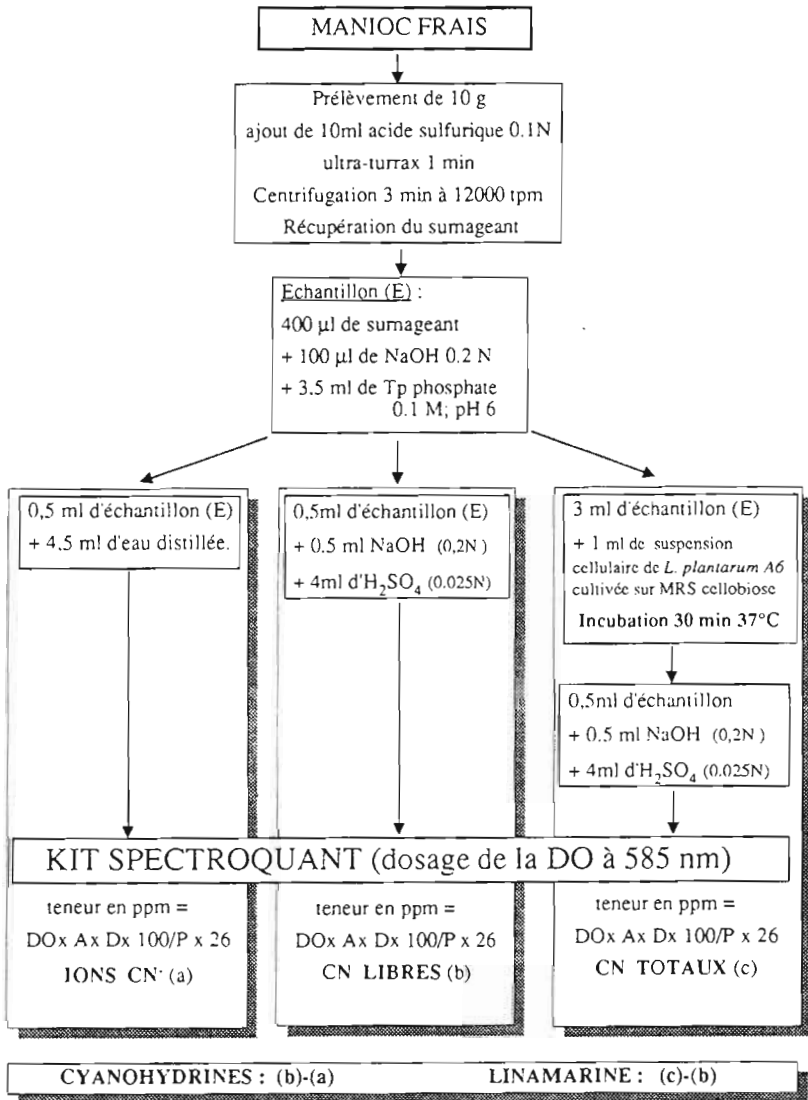


Figure 3.2 : Schéma du protocole de dosage des ions cyanures, des cyanures libres, des cyanohydrines, des cyanures totaux et de la linamarine dans le manioc. L'ajout des réactifs doit être effectué dans l'ordre indiqué.

3.7 - Dosages des activités enzymatiques

3.7.1 - Dosage de l'activité amylase

L'activité amylasique a été estimée, au début de notre étude, par la vitesse d'apparition des sucres réducteurs, puis par la suite, par la vitesse d'hydrolyse de l'amidon.

** Mesure par la vitesse d'apparition des sucres réducteurs.*

L'extrait enzymatique est d'abord lavé par ultrafiltration du sumageant de culture en utilisant une cellule Amicon avec une membrane d'exclusion de 10 kDa. Cette opération est nécessaire pour supprimer les sucres réducteurs présents en grande quantité dans le sumageant et qui interféreraient par la suite, avec le dosage. L'activité amylasique est alors dosée par ajout de 0.1 ml d'extrait enzymatique à 0.8 ml d'une solution contenant 1,2 % d'amidon soluble (Prolabo) dans un tampon phosphate 0.1 M; pH 6. La réaction est stoppée par addition de 0.1 ml de NaOH 5 N. L'augmentation du pouvoir réducteur est mesurée à différents temps d'incubation à 40°C, suivant la méthode décrite au § 3.5.1.2.

Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire à la production d'une μ mole d'équivalent réducteur par minute.

** Mesure par la vitesse d'hydrolyse de l'amidon.*

L'activité amylasique est mesurée par ajout de 0.1 ml d'extrait enzymatique à 0.8 ml d'une solution contenant 1.2 % d'amidon soluble (Prolabo) dans un tampon citrate/phosphate 0.1 M ; pH 5,5. La réaction est stoppée par addition de 0.1 ml d' H_2SO_4 2 N. L'amidon résiduel est dosé à différents temps d'incubation à 55°C, suivant la méthode décrite au § 3.5.1.3.

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

3.7.2 - Dosage de l'activité aryl- β -glucosidase

L'activité aryl- β -glucosidase a été mesurée sur les cellules entières. Elle a été estimée par dosage du pNP libéré lors de l'hydrolyse du pNPG. Le pNP, composé jaune, est dosé par spectrophotométrie à 400 nm selon la méthode de BLONDIN *et al.* 1983. La coloration est amplifiée en présence de Na_2CO_3 , qui sert aussi d'agent dénaturant pour stopper la réaction enzymatique.

Le mode opératoire est le suivant : les cellules provenant d'une culture de 1 ml à 10 ml

Matériel et Méthodes

(suivant l'activité attendue) sont centrifugées, lavées dans de l'eau physiologique et remises en suspension dans 4 ml de tampon acétate 0,1 M ; pH 5,5. La réaction est déclenchée par ajout de 1 ml de substrat (pNPG 50 mM dans tampon acétate 0,1 M ; pH 5,5). A différents temps d'incubation à 30°C, des fractions aliquotées de 0,5 ml sont prélevées et mélangées à 2 ml de Na_2CO_3 ; 0,2 M. La DO est lue à 400 nm contre un blanc, après centrifugation des tubes pour éliminer le trouble dû aux cellules en suspension.

Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme permettant l'hydrolyse d'une μmole de pNPG par minute.

3.7.3 - Dosage de l'activité linamarase

L'activité linamarase a été mesurée sur les cellules entières de bactéries lactiques, ou directement sur le manioc. Elle a été estimée par le dosage de l'acide cyanhydrique libéré lors de l'hydrolyse de la linamarine.

Les cellules provenant d'une culture de 1 ml à 10 ml (suivant l'activité attendue) sont centrifugées, lavées dans de l'eau physiologique et remises en suspension dans 450 μl de tampon acétate 0,1 M ; pH 5,5. La réaction est déclenchée par ajout de 50 μl de substrat (linamarine 0,1 M dans tampon acétate 0,1 M ; pH 5,5). A différent temps d'incubation à 30°C, des fractions aliquotées de 50 μl sont prélevées et mélangées à 50 μl de NaOH 0,1 N, en tubes Eppendorf bouchés et placés dans la glace. Il a été montré que le NaOH apporté était suffisant pour amener le pH à 13 et dissocier ainsi irréversiblement l'acétone cyanohydrine. Il permet d'autre part, de bloquer la réaction enzymatique, au cours de laquelle un ion CN^- est libéré par molécule de linamarine hydrolysée.

Dosage des ions cyanures formés :

A la fin de la cinétique, les cyanures de chaque tube d'arrêt sont dosés simultanément :

. 50 μl d' H_2SO_4 0,1 N sont ajoutés aux 100 μl du mélange précédemment constitué. L'acide permet de rétablir un pH proche de 5, nécessaire au bon développement de la réaction colorée par la méthode Spectroquant.

. 850 μl d'eau sont ajoutés (volume total 1ml).

. 100 μl de ce mélange sont alors prélevés et dilués dans 4,9 ml d'eau distillée (dilution globale : 1000 fois). Les cyanures y sont dosés à l'aide du Kit Spectroquant (cf. § 3.6).

La DO est lue à 585 nm contre un blanc, après centrifugation des tubes pour éliminer le trouble dû aux cellules en suspension. Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme permettant l'hydrolyse d'une μ mole de linamarine par minute.

3.8 - Techniques de purification de l' α -amylase de *L. plantarum* A6

L'extrait enzymatique brut (surnageant de culture obtenu à la fin de la phase de croissance de *L. plantarum* A6 en bioréacteur sur MRS amidon) récupéré par centrifugation à 10000 g pendant 15 min, a été filtré sur filtre Millipore HAWP de 0,45 μ m afin de supprimer les débris cellulaires.

3.8.1 - Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

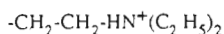
Les protéines ont été fractionnées par additions successives de sulfate d'ammonium à 4°C. Quatre fractions ont été obtenues après avoir atteint 30%, 50%, 70% et 90% en sulfate d'ammonium. Les protéines précipitées ont été centrifugées 15 min à 15000 tpm. Un dosage de l'activité amylasique de chaque précipité redissous dans 40 ml de tampon phosphate pH 6.8 ; 50 mM, a été effectué afin de sélectionner la fraction contenant l'activité enzymatique recherchée.

3.8.2 - Ultrafiltration

La concentration et le lavage de l'extrait enzymatique (obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium à 70%) ont été réalisés dans un tampon phosphate pH 6.8 ; 50 mM à l'aide d'une cellule Amicon munie d'une membrane de limite d'exclusion 10 kDa. Une surpression de 3 bars a été appliquée avec de l'azote. Une faible agitation à l'aide d'un barreau magnétique permet d'éviter le colmatage de la membrane. Cette opération a été effectuée à 4°C.

3.8.3 - Chromatographie sur DEAE-Cellulose

Cette chromatographie d'échanges d'anions a été réalisée à l'aide du gel DEAE-Cellulose DE52 (Whatman, ref. 4057 050). Ce gel est constitué d'une matrice de cellulose sur laquelle ont été greffées des fonctions amines quaternaires diéthylaminoéthyl :



Réalisation de l'élution :

Le volume de gel utilisé a été d'environ 110 ml, l'élution s'est déroulée en deux temps :

- élution des protéines non fixées avec 330 ml de tampon phosphate pH 6,8 ; 50 mM
- élution des protéines fixées sur le gel à l'aide d'un gradient de NaCl de 0 à 0,6 M.

Description du système :

- Dimensions de la colonne : 25 cm de longueur ; 2,5 cm de diamètre
- Débit : 2,5 ml/min
- Température : 25°C
- Volume des fractions : 5 ml

Les fractions contenant l'activité amylasique ont été rassemblées puis dialysées pendant une nuit contre du tampon phosphate pH 6,8 ; 50 mM. L'extrait enzymatique ainsi obtenu a servi pour la caractérisation de l'enzyme, il a été fractionné puis conservé à -30°C. Aucune perte notable d'activité n'a été observée après 6 mois de conservation.

3.9 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Celles-ci ont été réalisées suivant le protocole de LAEMMLI (1970). Un gel de concentration ou "stacking gel" est coulé au dessus du gel de séparation ou "running gel" dans le but d'assurer une concentration des protéines avant leur séparation.

3.9.1 - Description générale du système

Les électrophorèses ont été réalisées à l'aide du dispositif Mini-Protéan II Electrophoresis Cell (Biorad) (ref. 165-2940), qui permet la réalisation de gels d'électrophorèse de 8 x 7.3 cm et de 0.7 mm d'épaisseur. Les solutions nécessaires à la migration et à la préparation des gels (10% p/v d'acrylamide) ont été préparées suivant les instructions du fournisseur BIORAD. Les migrations ont été effectuées à température ambiante, sous l'action d'un courant électrique continu de 150V. La faible épaisseur des gels permet une migration totale en une heure environ.

Les électrophorèses en conditions natives ou dénaturantes ont été réalisées de façon identique, avec les mêmes solutions, mais avec un ajout de SDS pour le second cas.

Avant d'être déposés dans les puits, les échantillons protéiques à analyser sont dilués au 1/4 dans le tampon d'échantillon. Dans le cas des conditions dénaturantes, du SDS et du β -mercaptoéthanol sont ajoutés aux échantillons avant de les chauffer à 100°C pendant 5 min.

3.9.2 - Révélation des gels

Différentes techniques de révélation ont été utilisées :

- Coloration des protéines totales au nitrate d'argent suivant OAKLEY *et al.*(1980),
- mise en évidence de l'activité amylasique sur les gels en conditions natives, selon le protocole suivant :

- 1) Incuber le gel 2 à 3 heures dans la solution A (selon l'activité attendue)
- 2) Bien rincer le gel à l'eau distillée
- 3) Ajouter la solution de Lugol

les bandes d'amylases apparaissent en quelques secondes sous forme de bandes claires sur fond brun foncé.

- 4) La coloration n'étant pas stable, il est nécessaire de prendre une photographie rapidement (10 min).

- Solutions requises : Lugol (solution prête à l'emploi) ; Solution A : amidon soluble (Prolabo) à 1% dans du tampon citrate/phosphate 0,1 M ; pH 5

3.10 - Observation au microscope électronique à balayage

Les échantillons destinés à la microscopie électronique doivent être fixés pour éviter toute déformation des structures et déshydratés complètement pour obtenir une métallisation homogène. La fixation des échantillons a été réalisée au formaldéhyde (BLAHA et PARIS, 1987). La composition du fixateur est la suivante : aldéhyde formique à 40% 10 ml ; acide acétique pur 10 ml ; éthanol absolu 85 ml.

Les échantillons introduits dans des petits paniers grillagés, ont été immergés 12 h dans le fixateur sous vide (afin d'éliminer les bulles d'air et faciliter la pénétration du fixateur au sein de l'échantillon). Les paniers ont été ensuite introduits dans quatre bains successifs de 30 min d'éthanol à 80%, puis 2 bains successifs d'éthanol à 95% et enfin 2 bains d'éthanol absolu.

L'opération de métallisation des structures a été réalisée après élimination totale de l'alcool. Pour cela, les paniers contenant l'échantillon ont été introduits dans un appareil à déshydratation par la méthode du point critique. Du CO₂ liquide recouvre les échantillons et l'alcool est totalement remplacé par le CO₂. A pression atmosphérique, le CO₂ est dégazé et les échantillons desséchés sont prêts pour la métallisation. Ceux-ci sont déposés sur du ruban adhésif double face et montés sur des plots disposés dans un appareil à pulvérisation cathodique (Polaron, Model E 5000). Une

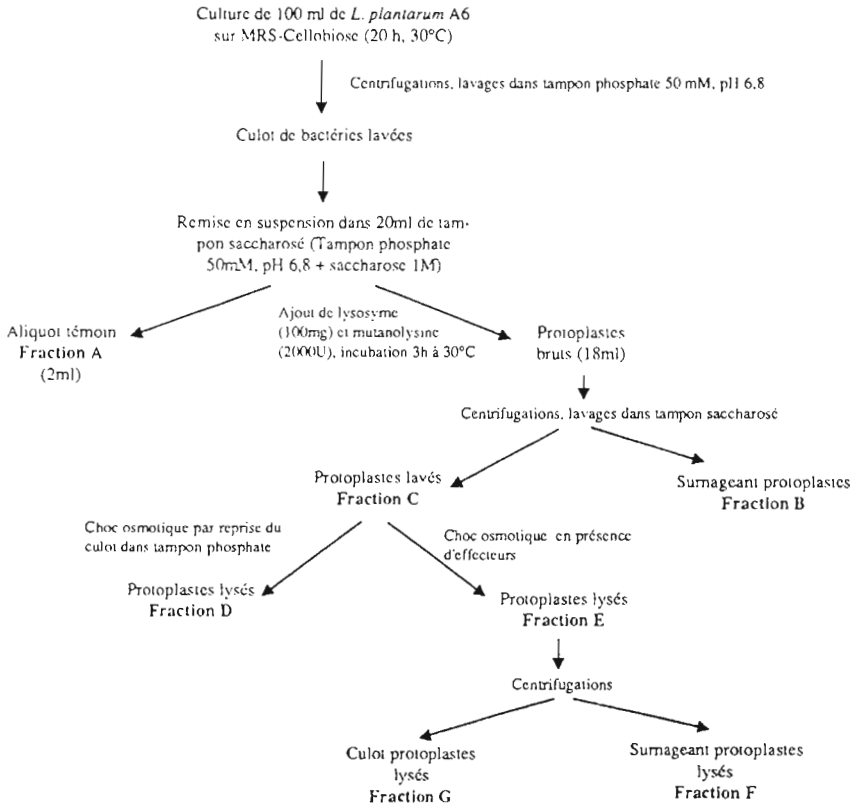
Matériel et Méthodes

fine pellicule d'or-palladium se dépose alors et les préparations deviennent conductibles.

Les échantillons sont enfin prêts pour l'observation au microscope à balayage. L'examen microscopique a été effectué en utilisant le microscope électronique JEOL J.S.M.35 de l'Université Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc (UM II). Les analyses ont pu être effectuées grâce à la collaboration de Mr DATAS de l'UM II.

3.11 - Obtention de protoplastes

Pour l'étude de la linamarase de *Lactobacillus plantarum* A6, nous avons été amenés à préparer des protoplastes selon le protocole décrit ci-dessous :



Matériel et Méthodes

3.12 - Etudes sur le gari

Le manioc en provenance du Cameroun a été obtenu par l'intermédiaire de la société Anarex (Paris, France). Les racines ont été épluchées, coupées en cubes, puis mélangées.

Après broyage des cubes dans un mixer, la pulpe obtenue est homogénéisée, inoculée ou non, et répartie en pots de 50 ml complètement remplis, fermés hermétiquement et placés à 30°C.

Trois séries ont été préparées : (a) fermentation naturelle avec la microflore présente ; (b) fermentation après inoculation avec *L. plantarum* A6 (10^8 cellules/g de manioc sec) préalablement cultivé en fermenteur sur MRS cellobiose ; (c) fermentation après inoculation avec *L. plantarum* Lactolabo (10^8 cellules/g de manioc sec) préalablement cultivé en fermenteur sur MRS cellobiose. Les cellules ont été lavées dans de l'eau physiologique avant inoculation du manioc.

Un pot de chaque série a été prélevé à différents temps pour effectuer les analyses suivantes :

- le pH a été mesuré sur un échantillon de 10 g homogénéisé avec 20 ml d'eau distillée à l'aide d'un pH mètre digital Knick muni d'une électrode Ingold.

- la matière sèche a été déterminée sur un échantillon de 10 g après séchage à 105°C pendant 24 h.

- l'activité linamarase endogène du manioc a été mesurée sur un échantillon de 5 g homogénéisé avec 5 ml de tampon phosphate 0,1 M ; pH 6.0 et finement broyé à l'Ultra-Turrax à froid. L'activité est mesurée sur le surnageant du broyat selon la méthode décrite au § 3.7.3.

- la flore lactique a été estimée à partir d'un échantillon de 10 g, homogénéisé dans 90 ml d'eau distillée stérile, par numération sur boîte de Pétri sur milieu MRS-Glucose, après 48 à 72 h d'incubation à 30°C selon le protocole décrit au § 3.4.

- Pour l'analyse des composés cyanurés et des acides organiques, 10 g de pulpe ont été broyés à froid 1 min à l'Ultra-Turrax dans 10 ml d' H_2SO_4 0,1 N. Cette baisse du pH inactive les activités linamarases (du manioc et des bactéries) et stabilise l'acétone cyanohydrine. Le surnageant du broyat récupéré par centrifugation est utilisé pour les analyses. Les acides sont dosés par HPLC sur un aliquot du surnageant filtré, selon la méthode décrite au § 3.5.2 . Les différentes formes de cyanures sont dosées selon la méthode décrite au § 3.6.

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 - Caractérisation des bactéries lactiques et physiologie de *L. plantarum*

4.1.1 - Introduction

Chaque bactérie lactique possède des caractéristiques métaboliques et des propriétés physiologiques bien spécifiques. Ainsi, le choix d'une souche comme starter dans une transformation agro-alimentaire va être fonction des qualités organoleptiques recherchées au niveau de l'aliment et des potentialités que peut offrir le microorganisme sélectionné.

Dans le cas des préparations traditionnelles à base de manioc et plus particulièrement dans le cas du gari, pour lequel une acidification importante associée à une production élevée d'acide lactique sont recherchées, nous pouvons définir un ensemble de critères que devrait présenter la souche "idéale" :

- développement rapide afin de s'imposer sur le développement de la microflore naturelle et surtout sur celui des microorganismes indésirables,
- acido-tolérance et diminution du pH le plus rapidement possible jusqu'à 3,9.
- production de forte quantité d'acide lactique et principalement l'isomère L(+) lactate,
- rendement de culture et production de biomasse élevés

D'autres critères peuvent également être ajoutés :

- hydrolyse les glucosides cyanogéniques du manioc afin d'en réduire la toxicité,
- capacité à métaboliser l'amidon, la pectine et éventuellement la cellulose.
- stabilité génétique de la souche.

Il semble évident qu'il est très difficile d'isoler la bactérie lactique répondant à l'ensemble de ces critères. Les progrès réalisés en biologie moléculaire permettront sans aucun doute de progresser dans cette voie. Cependant, l'inoculation d'un milieu non stérile, tel que la pulpe de manioc, avec une seule souche peut poser des problèmes. Un mélange de plusieurs microorganismes qui réuniraient l'ensemble de ces critères aurait plus de chance de se maintenir dans des conditions non aseptiques.

Au cours de cette étude, notre objectif a été dans un premier temps, de mieux connaître la physiologie des bactéries lactiques, que l'on sait relativement complexe, afin de sélectionner une souche qui répondrait le mieux aux principaux critères précédemment décrits. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement à la physiologie de la souche retenue.

4.1.2 - Caractérisation de différentes souches de bactéries lactiques

Cette étude préliminaire a été réalisée d'une part, pour mieux définir les caractéristiques morphologiques et physiologiques des principaux genres de bactéries lactiques, et d'autre part suivre en bioréacteur le comportement cinétique des différentes souches étudiées.

4.1.2.1 - Caractérisation morphologique

Les principales observations morphologiques macroscopiques et microscopiques des différentes souches étudiées, sont présentées dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Caractères morphologiques des principales souches de bactéries lactiques.

Souche	Aspect des colonies	Aspect des bactéries
<i>Lactobacillus plantarum</i> (Lacto Labo)	Colonie lisse, ø 3mm, régulière, légèrement bombée, opaque, couleur blanche crème	Petits bâtonnets, isolés, par paires ou en courtes chaînes
<i>Lactobacillus sake</i> (ORSTOM)	Colonie lisse, ø 3mm, régulière, légèrement bombée, opaque, couleur blanche	Petits bâtonnets, isolés, par paires ou en courtes chaînes
<i>Lactobacillus brevis</i> CNCM 102806	Colonie rugueuse, ø 2-3mm, couleur blanchâtre, légèrement translucide	Bâtonnets de très courte taille, isolés ou en courtes chaînes
<i>Streptococcus lactis</i> CNRZ 145	Petite colonie, ø 0,5 -1 mm, régulière, lisse, blanche	Coques, plus ou moins allongées souvent par paires ou en courtes chaînes
<i>Streptococcus cremoris</i> CNRZ 111	Petite colonie, ø 0,5 -1 mm, régulière, lisse, blanche	Coques, plus ou moins allongées formant de longues chaînes
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 20G	Colonie blanche, ø 2mm, régulière, lisse, légèrement bombée	Coques lenticulaires par paires ou en courtes chaînes
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i> CNCM 103009	Colonie blanche, ø 2-3 mm, contour translucide, régulière	Coques formant de longues chaînes
<i>Leuconostoc dextranicum</i> INRA 18G	Colonie blanche, ø 2mm, régulière, lisse, légèrement bombée	Coques plus ou moins allongées, par paires ou en courtes chaînes
<i>Pediococcus damnosus</i> DSM 20311	Colonie légèrement jaunâtre, ø 2 mm, lisse, régulière, légèrement bombée,	Coques sphériques par paires ou par tétrades
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CNCM 102260	Colonie blanche, ø 2-3 mm, lisse, régulière	Coques sphériques par paires ou par tétrades

En règle générale, les colonies de l'ensemble des souches étudiées ont le même aspect : elles sont lisses, légèrement bombées, régulières, translucides ou opaques, de taille plus ou moins importante et de couleur généralement blanche. Les bactéries sont toutes Gram +, en forme de coques plus ou moins allongées disposées par paires, en chaînettes ou en tétrades, pour les genres *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*, en forme de petit bacille, pour le genre *Lactobacillus*.

L'observation morphologique des colonies ne suffit pas ainsi à elle seule pour différencier les principaux genres de bactéries lactiques et encore moins les différentes espèces. Des tests biochimiques supplémentaires se révèlent indispensables pour pouvoir identifier les différentes souches (galerie API).

4.1.2.2 - Caractérisation du type homo ou hétérofermentaire

La définition du type homo ou hétérofermentaire permet de mieux caractériser le genre d'une bactérie lactique. Une technique d'analyse par HPLC a été mise au point au laboratoire pour l'analyse des acides organiques, sucres et alcools. Les surnageants de culture des différentes bactéries lactiques étudiées, après croissance sur milieu MRS pendant 2 jours d'incubation à 30°C, ont été analysés par cette technique. Le tableau 4.2 résume les résultats de ces analyses.

De façon générale, nous avons noté pour l'ensemble des souches :

- une consommation plus ou moins importante du glucose selon la souche.
- la production d'acide lactique et pour certaines souches, d'éthanol et d'acide acétique en très faible quantité,
- l'absence de production d'acides propionique, butyrique, isobutyrique, valérique et isovalérique (AGV retrouvés en quantités plus ou moins importantes dans le manioc roui, communication personnelle, BRAUMAN).

Nous avons observé que les chromatogrammes obtenus sont relativement semblables, avec peu de pics spécifiques propres aux différentes souches étudiées, à l'exception :

- d'un pic à 14,62 min détecté en UV pour *Lactobacillus brevis*,
- d'un pic plus important à 25 min en UV pour les souches *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides*,
- d'un pic beaucoup plus important à 17,11 min en UV pour *Lactobacillus plantarum*

Nous n'avons pas cherché à identifier les composés correspondant à ces pics particuliers.

Tableau 4.2 : Détermination du métabolisme homo ou hétérofermentaire de différentes bactéries lactiques par analyse par HPLC du surnageant de culture après croissance sur MRS glucose (20 g/l) à 30°C pendant 48 h.

Souche	Glucose résiduel (g/l)	Acide lactique (g/l)	Acide acétique (g/l)	Ethanol (g/l)	pH final	Rendement (%) acide lactique/ métabolites produits	Rendement (%) acide lactique/ glucose consommé	Métabolisme homo ou hétérofermentaire
<i>L. plantarum</i>	0	16,9	0,6	0	3,75	97	85	Homo
<i>L. sake</i>	6,6	12,7	0,7	0	3,96	95	95	Homo
<i>L. brevis</i>	0	8,7	1,6	4,2	4,34	60	44	Hétéro
<i>S. cremoris</i>	13,1	6,5	0,15	0	4,39	98	94	Homo
<i>S. lactis</i>	11,5	8,1	0,15	0	4,26	98	95	Homo
<i>L. mesenteroides</i>	0	9,4	0,6	4,4	4,17	65	47	Hétéro
<i>L. dextranicum</i>	0	9,2	0,6	4,2	4,20	66	46	Hétéro
<i>L. cremoris</i>	1,5	8,4	1,2	3,7	4,37	63	45	Hétéro
<i>P. damnosus</i>	11,1	8,3	0	0	4,26	100	93	Homo
<i>P. pentosaceus</i>	2,8	16,2	0,6	0	3,80	96	94	Homo

Il ressort de cette étude que l'analyse des profils chromatographiques obtenus par HPLC ne permet pas d'identifier une souche. Cependant, il apparaît que les rendements acide lactique/métabolites produits et acide lactique/glucose consommé, sont de l'ordre de 85% à 100% dans le cas des souches homolactiques, alors que ces rendements sont nettement inférieurs pour des souches hétérolactiques. L'analyse par HPLC du sumageant de culture d'une bactérie lactique, s'avère donc être une technique appréciable pour déterminer le caractère homo ou hétérolactique du microorganisme étudié. Nous pouvons ainsi vérifier le caractère hétérolactique des souches appartenant au genre *Leuconostoc* et de la souche *Lactobacillus brevis*, et le caractère homolactique des souches appartenant aux genres *Streptococcus* et *Pediococcus* ainsi que certaines souches du genre *Lactobacillus*.

Cette technique pourra être appliquée pour faciliter le screening d'isolats obtenus à partir d'échantillons de manioc fermenté (cf § 4.2). En effet, elle permettra de classer les souches en fonction du type de fermentation réalisée (lactique ou non, homolactique ou hétérolactique), de leur capacité à dégrader différentes sources de carbone en particulier l'amidon, et de leur capacité à produire l'acide lactique en grande quantité.

Nous observons que la mesure du pH final ne peut donner qu'une légère indication de la voie métabolique utilisée. En effet, chez les souches hétérolactiques, le pH minimum est proche de 4,2, malgré une consommation totale du glucose, alors que dans le cas des souches homolactiques, ce pH peut être plus faible (3,75 pour *L. plantarum*). Il est à noter que MCDONALD *et al.* (1987) ont mis à profit ces variations, pour différencier le métabolisme homo ou hétérofermentaire, en développant une méthode sur milieu gélosé, basée sur l'utilisation d'un indicateur de pH (le vert de bromocrésol). Dans ces conditions, les colonies de bactéries homolactiques apparaissent bleues, alors que les colonies de bactéries hétérolactiques restent blanches.

Si les principaux critères retenus pour la sélection d'une souche en vue de son utilisation comme starter de la fermentation du manioc, sont de favoriser une baisse rapide du pH ainsi qu'une production importante d'acide lactique, nous orienterons notre choix vers les souches *L. plantarum* et *P. pentosaceus*. Les souches du genre *Streptococcus* et *Leuconostoc* ne semblent pas satisfaire à ces deux critères dans les conditions utilisées.

4.1.2.3 - Comportement cinétique des bactéries lactiques cultivées en bioréacteur

Un des objectifs étant de produire des starters lactiques simples ou composés, il était essentiel de connaître les possibilités de production en masse des souches lactiques dans des conditions contrôlées. Pour cela, nous avons réalisé une série de fermentations en bioréacteur à pH régulé à 6, avec les souches précédemment étudiées.

Nous avons utilisé un milieu standard (milieu MRS modifié enrichi en glucose à 50 g/l) qui permet la croissance de la majorité des espèces de bactéries lactiques (REUTER, 1985). Le tableau 4.3 résume les principaux paramètres de fermentation obtenus.

Tableau 4.3 : Paramètres de fermentation des bactéries lactiques étudiées. (n.d. : non déterminé).

Souche	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	Biomasse finale (g/l)	Lactate final (g/l)	Ethanol final (g/l)	Temps de fermentation (h)
<i>L. plantarum</i>	0.52	0.2	0.78	8,5	39,3	0,0	10-12
<i>L. sake</i>	0.43	0.12	0.8	4,2	42,4	0,0	18-20
<i>L. brevis</i>	n.d.	0.05	0.41	2,2	20,7	11,7	28-30
<i>S. lactis</i>	0.59	0.09	0.82	4,1	41,5	0,0	10-12
<i>S. cremoris</i>	n.d.	0.07	0.85	1.0	42,7	0,0	58-60
<i>L. mesenteroides</i>	0.43	0.04	0.47	1,8	23.4	10.8	10-12
<i>L. dextranicum</i>	0.4	0.04	0.45	2.1	22,0	10,4	23-25
<i>L. cremoris</i>	n.d.	0.03	0.43	2.0	23.3	10.7	55-57
<i>P. pentosaceus</i>	0.46	0.11	0.75	5.6	41.8	0.0	10-12
<i>P. damnosus</i>	n.d.	0.04	0.815	1,8	41.8	0,0	65-75

Remarque : la phase de croissance exponentielle pour certaines souches étant très courte, il n'a pas été possible d'estimer correctement la valeur du taux de croissance.

Plusieurs observations peuvent être faites à partir de cette étude. En particulier, nous pouvons noter :

- une production d'acide lactique jusqu'à épuisement du glucose dans le milieu, quelque soit la souche considérée. Certaines bactéries (*L. brevis*, *S. cremoris*, *L. cremoris*, *P. damnosus*) requièrent une attention particulière. En effet, après une phase de croissance très brève, ces bactéries passent rapidement en phase stationnaire mais continuent néanmoins à transformer le glucose en acide lactique, révélant ainsi un phénomène de découplage énergétique. Ce phénomène est particulièrement important et se situe au croisement des deux principales voies d'utilisation des bactéries lactiques : d'une part, la production de biomasse pour leur utilisation comme starter, d'autre part, la production d'acide lactique à partir de sucres, grâce à l'utilisation de microorganismes en phase stationnaire de croissance (bioconversion).

Résultats et discussion

- des rendements et des teneurs en acide lactique très homogènes pour les bactéries lactiques caractérisées par la même voie fermentaire (homo ou hétérofermentaire).

- une forte hétérogénéité, par contre, en ce qui concerne les rendements en biomasse pouvant aller de 0,03 à 0,2 g de biomasse produite par g de glucose dégradé. Le maximum de production est obtenu pour *L. plantarum* avec un rendement proche de 20%, ce qui est très élevé pour une bactérie non aérobie. Le très faible rendement obtenu pour certaines souches peut être attribué à des exigences nutritionnelles bien spécifiques, à une inhibition par certains constituants présents ou produits dans le milieu, ou bien encore à des conditions de culture (température, pH, oxygène dissous..) non favorables.

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus au cours de l'étude en Erlenmeyers, réalisée sans régulation de pH (cf. § 4.1.2.2), montre une différence significative de comportement de certaines souches. En effet, les souches du genre *Streptococcus*, les souches *Pediococcus damnosus* et *Lactobacillus sake* n'avaient consommé qu'une faible quantité du glucose initialement présent dans les Erlenmeyers, alors qu'elles se sont montrées capables en bioréacteur, de dégrader très rapidement une quantité 2,5 fois plus importante de glucose.

Cette observation démontre clairement que le pH influence fortement le phénomène de découplage énergétique. Dans les conditions naturelles de fermentation du manioc pour lesquelles, aucune régulation du pH n'est réalisée, il est probable que la production d'acide lactique atteindra rapidement un palier malgré l'inoculation massive d'une souche lactique et la présence éventuelle de sucres fermentescibles résiduels.

Il apparaît ainsi, qu'outre sa capacité à être produite en masse, un critère essentiel à retenir lors de la sélection d'une souche en vue de son utilisation comme ferment lactique dans les transformations traditionnelles du manioc, sera sa capacité à provoquer dans des conditions non contrôlées, une baisse importante de pH et à produire des quantités élevées d'acide lactique. La souche de *L. plantarum* semble répondre à l'ensemble de ces critères. Par ailleurs, il faut souligner que des essais d'inoculation massive de la pulpe de manioc avaient déjà été réalisés en utilisant des starters de bactéries lactiques (*L. plantarum*, *L. acidophilus*, *Streptococcus* sp. en culture pure ou mixte). Les résultats obtenus ont montré que l'utilisation de *L. plantarum*, seule ou associée avec *Streptococcus* sp., permettait d'obtenir une baisse plus rapide et importante du pH de la pulpe ainsi que le développement du goût caractéristique du gari (NGABA et LEE, 1979). De même, REGEZ *et al.* (1988) ont évalué l'importance de quelques souches de *Lactobacillus* au niveau de l'acidification de différents aliments à base de manioc. Ils ont observé que *L. plantarum* était la souche permettant la plus forte acidification, suivie de *L. casei*, *L. fermentum* et *L. brevis*. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que l'ensemencement contrôlé de *L. plantarum* pourrait avoir un effet positif sur la qualité microbiologique et organoleptique du produit.

4.1.3 - Physiologie de *L. plantarum*

Ces dix dernières années, des études physiologiques et biochimiques réalisées sur d'autres souches lactiques, *Streptococcus lactis* et *S. cremoris*, ont montré que l'excrétion de lactate pouvait être couplée à 2 protons, permettant dans des conditions optimales de culture, la synthèse supplémentaire de 2 molécules d'ATP équivalent par molécule de lactose consommé grâce à une ATPase (MALONEY et HANSEN, 1982). Ce processus conduirait à un gain d'énergie de 50% pour une bactérie homolactique et de 100% pour une bactérie hétérolactique (BRINK et KONINGS, 1982).

Il apparaît en outre, que la stœchiométrie proton/lactate excrété et le gain d'énergie supplémentaire disponible pour la bactérie dépend fortement des conditions externes (pH et concentration en lactate) (OTTO *et al.*, 1980 ; BRINK *et al.*, 1985).

Nous avons donc étudié l'effet du pH et de la concentration en lactate sur la croissance de *L. plantarum*. L'étude cinétique de la croissance et le calcul des principaux paramètres de fermentation, en particulier le YATP, dans ces différentes conditions de culture, doit permettre de mieux comprendre la physiologie de ce microorganisme, en vue d'optimiser sa production de sa biomasse.

4.1.3.1 - Cinétique de croissance et découplage énergétique de *L. plantarum*

La figure 4.1 représente l'évolution des concentrations en biomasse, glucose et acide lactique pour une fermentation type, réalisée à une concentration initiale en sucres voisine de 50 g/l. Dès le début de la culture, les concentrations en biomasse et en acide lactique augmentent rapidement jusqu'à 7 heures de fermentation. L'arrêt de la croissance intervient alors brusquement juste avant épuisement du glucose dans le milieu. L'addition de 40 g/l de glucose supplémentaire ne permet pas d'augmenter la concentration en biomasse, mais nous observons que les cellules continuent cependant à produire de l'acide lactique jusqu'à épuisement du substrat.

Il apparaît donc que l'arrêt de la croissance est lié à une limitation d'un élément nutritif autre que le substrat carboné. Dans ces conditions cette bactérie est capable de réaliser un découplage énergétique entre la croissance et la production d'acide lactique.

La concentration finale cellulaire est de 9 g/l avec un rendement $Y_{x/s}$ de 0.22 g/g, soit un YATP proche de 20 g de biomasse/mole d'ATP produite (YATP calculé sur la base de 2 molécules d'ATP produites par molécule de glucose consommé), ce qui est élevé pour ce type de microorganisme.

Résultats et discussion

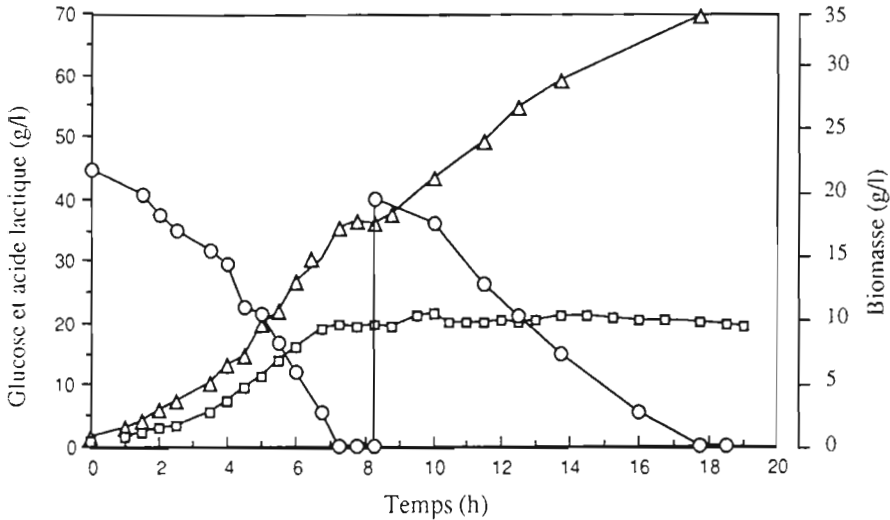


Figure 4.1 : Croissance et découplage énergétique de *L. plantarum* sur milieu MRS avec ajout de 40 g/l de glucose après 8 heures de fermentation. ○ . glucose ; Δ . acide lactique ; □ . biomasse.

4.1.3.2 - Effet du pH

Des cultures en batch ont été réalisées à différents pH, régulés et compris entre 4 et 8. Les évolutions de la concentration en biomasse aux différents pH étudiés durant les dix premières heures de culture, sont représentées sur la figure 4.2.

En ce qui concerne le taux de croissance, l'optimum de pH est proche de 6 (cf. fig. 4.3). Les valeurs limites, pour lesquelles toute croissance devrait être inhibée, peuvent être estimées à 3,4 et 8,8. Les rendements de fermentation obtenus pour chacun des pH étudiés sont présentés dans le tableau 4.4. Les rendements en biomasse ($Y_{x/s}$), en lactate ($Y_{p/s}$) ainsi que le rendement Y_{ATP} restent très élevés dans la gamme de pH étudiés ; les valeurs maximales ont été obtenues à pH 4. Néanmoins à ce pH, le taux de croissance mesuré est le plus faible. Le pH apparaît donc avoir un effet beaucoup plus important sur le taux de croissance que sur les rendements de fermentation. Notons que BIBAL *et al.* (1988) lors de leur étude concernant l'influence du pH sur la croissance de *Streptococcus cremoris*, n'ont observé aucune variation significative de ces rendements dans une gamme de pH allant de 5,6 à 7,5.

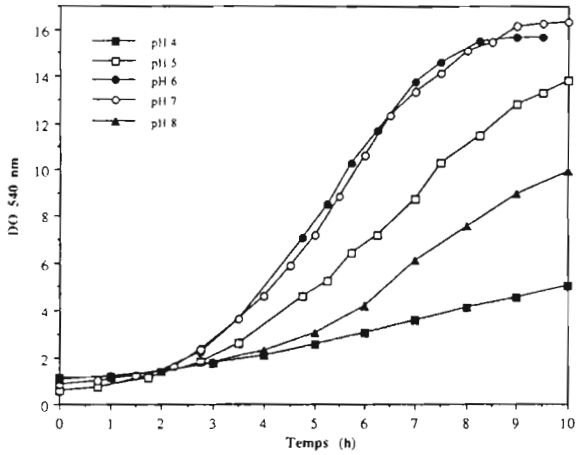


Figure 4.2 : Evolution de la biomasse pour des cultures de *L. plantarum* réalisées à différents pH, sur un milieu contenant 50 g/l de glucose.

Tableau 4.4 : Paramètres de fermentation de *L. plantarum* cultivé à différents pH.

pH	μ	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	Y_{ATP}	Productivité	$Y_{X/S} + Y_{P/S}$
	h ⁻¹	g/g	g/g	g/mole		
4	$0,19 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,09$	$24,3 \pm 2,7$	0,29	$1,00 \pm 0,11$
5	$0,46 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,06$	$22,9 \pm 1,5$	0,77	$0,95 \pm 0,08$
6	$0,57 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,04$	$19,8 \pm 2,6$	1,05	$0,97 \pm 0,07$
7	$0,52 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,03$	$0,81 \pm 0,05$	$23,2 \pm 2,3$	1,04	$1,07 \pm 0,08$
8	$0,29 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,02$	$0,81 \pm 0,09$	$16,2 \pm 1,8$	0,52	$0,99 \pm 0,11$

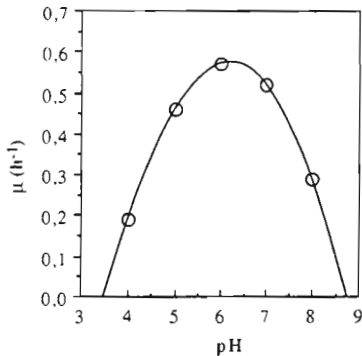


Figure 4.3 : Influence du pH sur le taux de croissance de *L. Plantarum*.

L'étude de l'influence du pH met en évidence la nécessité de contrôler et réguler le pH à 6 pour assurer une productivité maximale en biomasse. Ce résultat est en accord avec celui de KEMP *et al.* (1989) qui déterminent le pH optimum de *L. plantarum* entre 5,5 et 6,5.

4.1.3.3 - Effet du lactate

L'acide lactique est décrit depuis longtemps comme étant le principal facteur de ralentissement et d'arrêt de la fermentation lactique. Toutefois, l'effet toxique du produit sur la croissance n'a pu être formellement établi que lors de cultures dans lesquelles il est éliminé par dialyse (FRIEDMAN et GADEN, 1970). Selon VICK ROY *et al.* (1983), l'effet néfaste du produit serait lié à la concentration en acide lactique non dissocié et pourrait être atténué en modifiant le pH de la culture. En fait, l'acide lactique modifie le potentiel membranaire et la stœchiométrie d'excrétion H^+ /lactate diminue de 1,5 à 0,9 pour *S. cremoris*, lorsque la concentration en produit augmente. L'énergie métabolique générée par l'excrétion de lactate est alors moins importante et ne permet plus de maintenir la même vitesse spécifique de croissance (BRJNK *et al.*, 1985).

L'effet inhibiteur de la concentration en lactate sur la croissance de *L. plantarum* a été étudié en comparant les cinétiques des fermentations réalisées avec différentes concentrations initiales en lactate, dans une gamme allant de 0 à 90 g/l, le pH a été régulé à 6. La figure 4.4 représente l'évolution de la biomasse, durant les dix premières heures de culture, aux différentes concentrations en lactate étudiées. Nous observons que le taux de croissance diminue linéairement lorsque la concentration initiale en lactate augmente. La concentration critique en lactate, pour laquelle le taux de croissance est nul, peut être estimée à 110 g/l (cf. fig. 4.5).

Les rendements $Y_{x/s}$, Y_{ATP} et la biomasse finale observés restent sensiblement constants jusqu'à une concentration en lactate voisine de 33 g/l (cf. tab. 4.5). Ils diminuent rapidement pour des concentrations supérieures et s'annulent pour une concentration critique estimée également à 100-110 g/l (fig 4.5). Notons que pour une concentration en lactate de 90 g/l, la somme des rendements $Y_{x/s}$ et $Y_{p/s}$ est de $0,73 \pm 0,04$ g/g, ce qui tendrait à montrer que dans des conditions extrêmes de concentration en lactate (1 molaire), près de 30% du substrat seraient utilisés pour assurer la maintenance des cellules.

Une concentration en lactate de 110 g/l peut être ainsi considérée comme étant la concentration limite tolérée par *L. plantarum*. BIBAL *et al.* (1988) observent chez *S. cremoris* une diminution du $Y_{x/s}$ dès l'ajout de 12 g/l de lactate et estiment la concentration critique à 70 g/l. Il apparaît donc que *L. plantarum* est un microorganisme beaucoup plus tolérant vis-à-vis de l'acide lactique que *S. cremoris*.

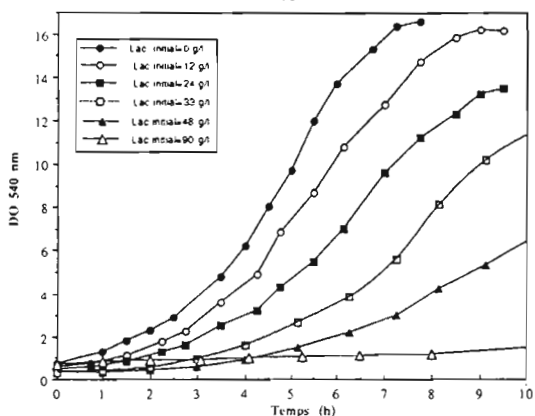


Figure 4.4 : Evolution de la biomasse pour des cultures de *L. plantarum* réalisées à différentes concentrations initiales en lactate sur un milieu contenant 50 g/l de glucose. pH = 6.

Tableau 4.5 : Paramètres de fermentation de *L. plantarum* cultivé à différentes concentrations initiales en lactate. pH = 6.

lactate g/l	μ h ⁻¹	Y _{x/s} g/g	Y _{p/s} g/g	Y _{ATP} g/mole	Productivité g/l.h	Y _{x/s} + Y _{p/s} g/g
0	0,57 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,75 ± 0,04	19,8 ± 2,6	1,05	0,97 ± 0,07
12	0,55 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,73 ± 0,05	19,8 ± 1,4	1,01	0,95 ± 0,06
24	0,49 ± 0,03	0,24 ± 0,01	0,75 ± 0,05	21,9 ± 1,1	0,8	0,99 ± 0,06
33	0,41 ± 0,05	0,22 ± 0,04	0,74 ± 0,09	19,8 ± 3,6	0,58	0,96 ± 0,13
48	0,37 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,61 ± 0,09	16,7 ± 2,3	0,45	0,8 ± 0,12
90	0,063 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,65 ± 0,03	7,1 ± 0,9	0,09	0,73 ± 0,04

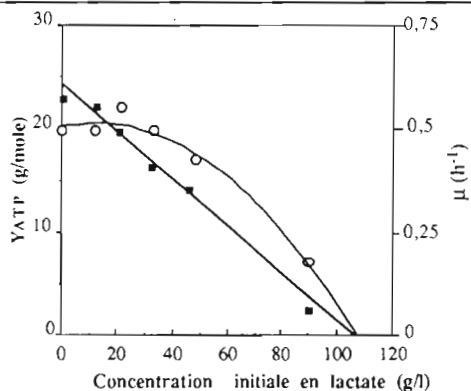


Figure 4.5 : Influence de la concentration initiale en lactate sur le taux de croissance et le YATP de *L. plantarum*. ■, μ ; ○, YATP.

Le métabolisme de la souche est toujours apparu comme étant homofermentaire ; nous n'avons en effet, jamais détecté de production d'acétate ou d'éthanol lors des analyses des surageants de culture par HPLC. Soulignons que RHEE et PACK (1980) observent chez *L. bulgaricus* le passage d'un métabolisme homofermentaire à un métabolisme hétérofermentaire en fonction du pH du milieu. Il faut également noter que MURPHY *et al.* (1985) décrivent pour *L. plantarum*, un métabolisme hétérofermentaire en présence d'oxygène dans le milieu. Le passage du métabolisme homolactique à hétérolactique semble ainsi être lié pour chaque microorganisme, à des conditions bien spécifiques que nous n'avons pas rencontrées dans notre étude.

Le rendement maximum YATP théorique pour des bactéries anaérobies Gram + a été estimé par BELAICH (1986) à 21-28 g/mole. Dans notre étude, le YATP de *L. plantarum* peut atteindre $24,3 \pm 2,7$ g/mole et la moyenne calculée dans des conditions non limitantes, se situe à $21,4 \pm 2,2$ g/mole, ce qui est très proche du rendement théorique maximum et près de 2 fois supérieur à la valeur généralement rapportée de 10,5 g/mole pour les bactéries anaérobies (BAUCHOP et ELSDEN, 1960). Ce résultat est en accord avec ceux de KEMP *et al.* (1989) qui obtiennent pour *L. plantarum*, un Yx/s de 0,27 g/g soit un YATP de 24,3 g/mole, mais diverge du YATP de 9,3 g/mole calculé à partir des résultats d'OXENBURGH et SNOSWELL (1965). Les divergences de nos résultats avec ces derniers travaux, peuvent s'expliquer par l'utilisation de conditions de culture différentes (milieu synthétique et croissance réalisée en Erlenmeyer sans régulation du pH). BELAICH *et al.* (1972) ont observé une forte influence de la composition du milieu sur la valeur du Yx/s. Dans le cas de *Zymomonas mobilis*, ils obtiennent, sur milieu synthétique, un rendement de 2,5 à 6,5 g/mole de glucose (suivant la concentration en pantothénate) alors que sur milieu complexe, ce rendement est de 8,61 g/mole. Les rendements plus faibles observés sur milieu simple pourraient résulter de la nécessité pour la cellule, de dépenser une grande quantité d'énergie pour produire, à partir des constituants simples du milieu, les monomères entrant dans la synthèse des polymères. Une autre explication envisageable serait l'existence, dans le milieu synthétique, d'un phénomène de découplage entre la croissance et la production d'énergie, provoqué par la vitesse limitante de synthèse d'un des constituants essentiels à la croissance du microorganisme.

BRINK et KONINGS (1982) ont émis l'hypothèse selon laquelle l'excrétion de lactate permettrait dans des conditions optimales, un gain de 50% d'énergie (soit une mole d'ATP supplémentaire produite par mole de glucose consommé). En considérant cette nouvelle donnée (3 molécules d'ATP produites par molécule de glucose consommé), la valeur du YATP moyen déterminée dans notre étude, serait alors égale à 13,2 g/mole, soit une valeur plus proche des valeurs de YATP généralement rencontrées. Cependant, nous observons pour *L. plantarum* que les valeurs de YATP restent toujours très élevées dans la gamme de pH et de lactate étudiée (à l'exception de l'expérience réalisée avec une concentration initiale en lactate de 90 g/l). Cette hypothèse seule ne peut donc être retenue pour expliquer les fortes valeurs de YATP rencontrées.

Il est à noter que l'assimilation du glucose dans la formation de polysaccharides intracellulaires peut entraîner de forts rendements en biomasse et donc des valeurs élevées du YATP. Nous n'avons pas vérifié l'absence de production de polysaccharides dans cette étude. Néanmoins, une valeur élevée de YATP de 18,2 à 20,9 g/mole, a déjà été rapportée par DE VRIES *et al.* (1970) dans le cas de *L. casei* pour lequel l'absence de production de polysaccharides avait été vérifiée. Nous pensons, comme ces auteurs, que les fortes valeurs de YATP déterminées ne sont pas dues à un artefact, mais seraient plutôt la conséquence d'un couplage très efficace entre le catabolisme et l'anabolisme.

4.1.4 - Conclusion

Cette étude a été réalisée afin de disposer d'une méthodologie plus complète pour la caractérisation des bactéries lactiques, et obtenir des données précises sur la physiologie de ces microorganismes.

Dans un premier temps, nous avons mis au point une technique d'analyse par HPLC permettant le dosage simultané de plusieurs acides organiques, du glucose, de l'éthanol, etc. Cette technique simple d'utilisation, fiable et précise, permet de doser simultanément plus de dix composés susceptibles d'intervenir au cours des fermentations traditionnelles du manioc. Elle nous a permis également de caractériser les principaux produits d'excrétion et de suivre les cinétiques de fermentation en bioréacteur, d'une dizaine de souches, regroupant les quatre principaux genres de bactéries lactiques.

Les résultats obtenus ont mis en évidence :

- le caractère homo ou hétérolactique des différentes souches étudiées,
- une sensibilité des souches du genre *Streptococcus*, de *Pediococcus damnosus* et *Lactobacillus sake* à des pH acides,
- la difficulté de produire en masse certains ferments lactiques.

Il ressort que parmi les souches étudiées, *Lactobacillus plantarum* semble la plus intéressante pour constituer un starter des fermentations à base de manioc. En effet, elle est homolactique, a une croissance rapide, est acido-tolérante et permet de diminuer rapidement le pH en dessous de 4. D'autre part, elle excrète de fortes quantités d'acide lactique et donne, dans les conditions étudiées, les meilleurs rendements en biomasse. Nous avons observé que les rendements de fermentation obtenus pour cette souche sont très élevés, mais que la concentration en biomasse reste limitée car au delà d'une concentration en substrat de 50 g/l, les bactéries sont l'objet d'un découplage énergétique et transforment quantitativement le glucose en acide lactique. L'optimisation de la concentration des autres éléments nutritifs du milieu devrait permettre d'améliorer la production de

Résultats et discussion

biomasse.

Le phénomène de découplage énergétique observé, pose le problème de la dissipation de l'énergie produite en excès. OTTO (1984) propose chez *S. cremoris*, la présence d'un cycle futile, composé de l'action conjointe de 2 enzymes : phosphofructokinase et fructose-1-6-disphosphatase, qui interviendrait dans l'hydrolyse de l'ATP en excès. L'analyse intracellulaire du pool de nucléotides adényliques leur a permis d'observer un rôle important de l'AMP dans la régulation de l'activité de ce cycle.

Ainsi, il nous a paru intéressant de suivre l'évolution du pool nucléotidique de *L. plantarum* dans différents états physiologiques (phase de croissance et de découplage énergétique). Pour cela, une méthode par HPLC déjà utilisée au laboratoire pour l'analyse de matériel végétal, a été modifiée et adaptée à l'analyse du pool nucléotidique de *L. plantarum*. La méthode qui fait intervenir une extraction en milieu acide et en milieu basique, permet la séparation et la détermination des concentrations intracellulaires en ATP, ADP, AMP, NAD⁺, NADP⁺, NADH et NADPH (BRUGIDOU *et al.*, 1991). Cependant, les travaux n'ont pas été poursuivis car d'importants problèmes de stabilité des nucléotides et de variation de temps de rétention ont été rencontrés. Des études plus approfondies, dépassant le cadre de ce programme s'avèrent donc nécessaires.

Dans un second temps, l'étude de l'influence du pH et du lactate, nous a permis de tirer les conclusions suivantes :

- le pH de la culture doit être maintenu constant à une valeur proche de 6 pour assurer une vitesse maximale de formation de biomasse,
- la concentration limite en lactate tolérée par *L. plantarum* est estimée à 100-110 g/l,
- dans la gamme de pH et de lactate étudiée, le métabolisme de la souche reste homofermentaire. Par ailleurs, les rendements en biomasse, en produit et le rendement YATP restent très élevés et reflètent un couplage très efficace entre le catabolisme et l'anabolisme chez ce microorganisme dans les limites mentionnées.

Les études réalisées restent insuffisantes pour considérer que cette souche de *L. plantarum* est le microorganisme le plus approprié pour constituer un starter efficace des fermentations à base de manioc. En effet, des essais d'inoculation de la pulpe de manioc avec cette souche seraient nécessaires pour déterminer si celle-ci est capable de supplanter le développement de la microflore naturelle et si son métabolisme n'entraîne pas des modifications organoleptiques indésirables pour le consommateur. Par ailleurs, d'autres propriétés importantes doivent être recherchées, d'une part la capacité à transformer l'amidon en acide lactique, d'autre part, la capacité à dégrader les glucosides cyanogéniques, afin de réduire la toxicité des aliments.

4.2 - Isolement et physiologie d'une nouvelle souche amylolytique de *L. plantarum* (A6)

4.2.1 - Introduction

Les racines de manioc étant constituées essentiellement d'amidon (plus de 86% de la matière sèche), la sélection d'une bactérie lactique capable de métaboliser ce composé semble particulièrement intéressante. En effet, l'inoculation avec une telle souche permettrait d'augmenter les teneurs finales d'acide lactique dans les aliments à base de manioc, mais surtout lui permettrait de se développer et de s'imposer par rapport à des souches non amylolytiques. Cependant, la capacité à hydrolyser l'amidon est une caractéristique peu fréquente chez les bactéries lactiques. Les principales souches identifiées comme telles, sont : *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *Lactobacillus amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. cellobiosus* (NAKAMURA et CROWELL, 1979 ; NAKAMURA, 1981 ; SEN et CHAKRABARTY, 1984 ; SNEATH, 1986). D'autres souches, isolées du tractus digestif des animaux, ont également été décrites dans la littérature comme étant des bactéries lactiques amylolytiques (CHAMP *et al.*, 1983 ; COTTA, 1988). Les connaissances sur la physiologie de ces microorganismes sont donc très limitées.

Le présent chapitre décrit l'isolement, l'identification et la sélection d'une bactérie lactique amylolytique (*Lactobacillus plantarum* A6) à partir de racines de manioc en cours de rouissage. La physiologie de cette bactérie ainsi que les propriétés de l'amylase produite ont également été étudiées .

4.2.2 - Isolement et identification de *L. plantarum* A6

Les isolements ont été effectués par Simom KELEKE (chercheur DGRST), au laboratoire de microbiologie du centre ORSTOM de Brazzaville (Congo), sur des racines de manioc (*Manihot esculenta* var Ngansa) ayant subi un rouissage traditionnel. Les racines de manioc ont été épluchées, plongées dans de l'eau de pluie et laissées fermentées naturellement. Après 4 jours de fermentation, un prélèvement a été effectué par tirage au sort de 6 racines, celles-ci ont été découpées puis homogénéisées dans des conditions stériles. Un screening de souches présentant la capacité d'hydrolyser l'amidon a été alors réalisé sur milieu JP2 à partir de cet échantillon. Pour cela, après incubation pendant 48 h à 30°C, les boîtes ont été exposées à des vapeurs d'iode pour mettre en évidence les zones d'hydrolyse de l'amidon. Les colonies présentant une zone d'hydrolyse ont été purifiées par trois repiquages successifs sur milieu JP2, leur pureté étant vérifiée à chaque repiquage, par microscopie optique. La capacité des souches isolées à produire de l'acide lactique à partir d'amidon, a été alors recherchée par l'analyse par HPLC de leur surnageant de culture après croissance sur un milieu MRS modifié contenant comme seule source de carbone de l'amidon à 20 g/l.

L'identification des microorganismes a été basée sur les examens suivants : 1) configuration de l'acide lactique produit, en utilisant la méthode enzymatique d'IVOREC-SZYLIT et SZYLIT (1965) ; 2) caractère homolactique ou hétérolactique, déterminé par la production d'acide lactique, d'acide acétique ou d'éthanol ; 3) présence de catalase ; 4) examen microscopique et macroscopique : morphologie, mobilité, spore ; 5) coloration de Gram ; 6) désamination de l'arginine ; 7) croissance à 15° et 45°C ; 8) fermentation de différents sucres (galerie API 50CH, # 5030, Biomérieux France). L'évaluation des résultats et l'identification des différentes souches ont été effectuées d'après le manuel de bactériologie systématique (SNEATH, 1986) et l'aide informatique de Biomérieux.

Sept microorganismes amylolytiques ont pu ainsi être isolés sur milieu JP2 à partir de racines de manioc roui. Parmi les sept souches, deux ont été sélectionnées pour leur capacité à produire de l'acide lactique à partir d'amidon (cf. fig. 4.6). Leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques sont présentées sur le tableau 4.6. Les profils fermentaires des carbohydrates de ces deux souches, comparés par informatique avec le pourcentage de réaction positive de différents *Lactobacillus* spp. donné par API, mettent en évidence 99,9% de similitude avec *L. plantarum* (cf. tab. 4.7). Les deux souches A6 et A43 sont probablement identiques car elles présentent exactement les mêmes profils de dégradation des sucres et des caractéristiques morphologiques et physiologiques identiques. Elles peuvent être identifiées à *L. plantarum*. La souche A6, dénommée à présent *L. plantarum* A6, a été choisie arbitrairement pour la suite de notre étude. Notons que c'est l'utilisation d'un nouveau milieu de culture (JP2), caractérisé par rapport au milieu MRS par une diminution importante des concentrations en peptone, en protéine assimilable et en substrat carboné, qui a permis l'isolement de cette souche.

La photo 4.1 montre l'aspect des colonies de *L. plantarum* A6 après culture sur MRS glucose. Les colonies apparaissent lisses, régulières, légèrement bombées, ø 2-3 mm. de couleur blanche. Nous pouvons observer (photo 4.2) que la zone d'hydrolyse de l'amidon de *L. plantarum* A6 est bien supérieure à celle de deux autres souches lactiques amylolytiques utilisées comme référence : *S. equinus* CNCM 103233 et *L. amylophilus* CNCM102988T.

Comme nous l'avons précédemment souligné, la présence d'amylase chez les bactéries lactiques a été reportée depuis longtemps. Cependant à notre connaissance, aucun auteur n'a décrit à ce jour de souche de *L. plantarum* comme étant amylolytique. L'étude de la microflore bactérienne de tubercules de manioc fermentés a permis à REGEZ et SCHMIDT-LORENZ (1988) l'isolement de nombreuses souches de *L. plantarum*, mais aucune à caractère amylolytique. Par ailleurs, notons que des études récentes (SCHEIRLINCK *et al.*, 1989) ont été réalisées afin d'intégrer le gène de l' α -amylase de *Bacillus stearothermophilus* dans le génome d'une souche de *L. plantarum*. Il reste néanmoins à vérifier l'expression, la stabilité et la compétitivité de la souche transformée en milieu naturel.

Résultats et discussion

La propriété exceptionnelle de cette souche de *L. plantarum* A6 à dégrader l'amidon, et visiblement avec une efficacité supérieure à celle de deux autres espèces de bactéries lactiques utilisées comme référence, nous a conduit à étudier plus en détail la physiologie de cette bactérie.

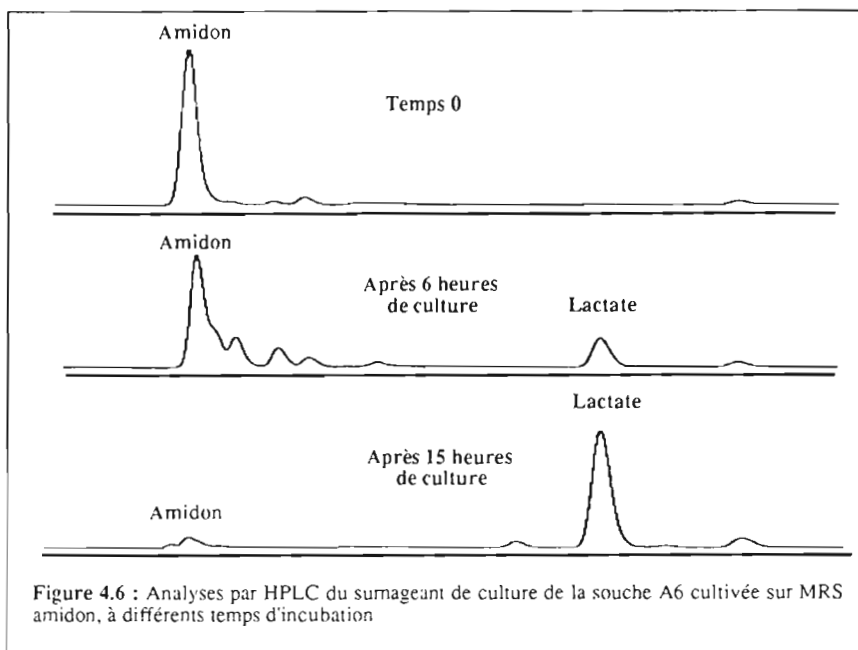


Figure 4.6 : Analyses par HPLC du surnageant de culture de la souche A6 cultivée sur MRS amidon, à différents temps d'incubation

Tableau 4.6 : Comparaison des caractéristiques morphologiques et physiologiques des souches A6 et A43 avec celles de *L. plantarum* de référence (Lacto Labo)

Souche	A6	A43	<i>L. plantarum</i> (Lacto Labo)
Rapport acide D/L lactique	(69/31)	(66/34)	(73/27)
Caractère Homolactique	+	+	+
Catalase	-	-	-
Forme de la bactérie	Petit bacille	Petit bacille	Petit bacille
Coloration de Gram	+	+	+
Spore	-	-	-
Mobilité	-	-	-
Désamination de l'arginine	-	-	-
Croissance à 15 °C	+	+	+
Croissance à 45 °C	-	-	-

Résultats et discussion

Tableau 4.7 : Fermentation de différentes sources de carbone par les souches A6, A43 et *L. plantarum* (Lacto Labo). * : % de réaction positive, (données API).

Sucres	<i>L. plantarum</i> ssp*	<i>L. plantarum</i> Lacto Labo	Souche A6	Souche A43
Témoin	0	-	-	-
Glycérol	22	-	-	-
Erythritol	0	-	-	-
D-Arabinose	0	-	-	-
L-Arabinose	69	+	+	+
Ribose	100	+	+	+
D-Xylose	13	-	-	-
L-Xylose	0	-	-	-
Adonitol	0	-	-	-
β Méthyl-D-xyloside	0	-	-	-
Galactose	93	+	+	+
D-Glucose	100	+	+	+
D-Fructose	100	+	+	+
D-Mannose	100	+	+	+
L-Sorbose	2	-	-	-
Rhamnose	27	-	-	-
Dulcitol	0	-	-	-
Inositol	0	-	-	-
Mannitol	97	+	+	+
Sorbitol	73	+	-	-
α Méthyl-D-mannoside	52	-	+	+
α Méthyl-D-glucoside	38	-	-	-
N Acetyl glucosamine	100	+	+	+
Amygdaline	97	+	+	+
Arbutine	100	+	+	+
Esculine	100	+	+	+
Salicine	97	+	+	+
Cellobiose	97	+	+	+
Maltose	100	+	+	+
Lactose	97	+	+	+
Mélibiose	88	+	+	+
Saccharose	80	+	+	+
Tréhalose	88	+	+	+
Inuline	0	-	-	-
Mélicézitose	80	+	+	+
D-Raffinose	72	+	+	+
Amidon	8	-	+	+
Glycogène	8	-	+	+
Xylitol	0	-	-	-
β Gentiobiose	94	+	+	+
D-Turanose	61	-	-	-
D-Lyxose	2	-	-	-
D-Tagatose	5	-	-	-
D-Fucose	0	-	-	-
L-Fucose	0	-	-	-
D-Arabitol	33	-	-	-
L-Arabitol	0	-	-	-
Gluconate	66	-	+	+
2 Céo-gluconate	0	-	-	-
5 Céo-gluconate	0	-	-	-



Photo 4.1 : Aspect des colonies de *L. plantarum* A6 cultivé sur milieu MRS glucose à 30°C pendant 72 h.

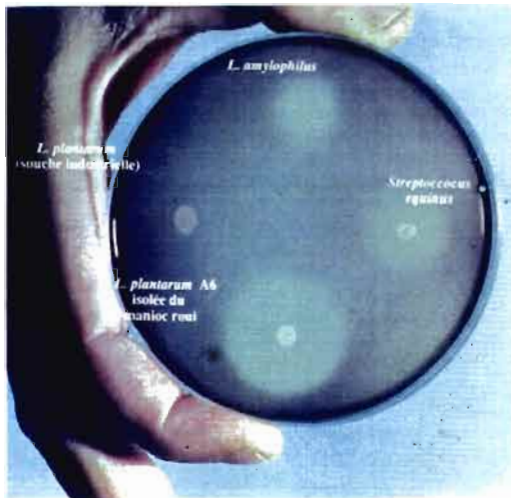


Photo 4.2 : Mise en évidence, sur boîte de Pétri, du pouvoir amylolytique de *L. plantarum* A6

4.2.3 - Cinétiques de croissance de *L. plantarum* A6

Les figures 4.7, 4.8, et 4.9, représentent les cinétiques de croissance, de consommation des sucres, de production d'acide lactique et de production d'enzyme amylolytique de *L. plantarum* A6, cultivé respectivement sur milieu MRS glucose, MRS amidon et MRS glucose + amidon. Les principaux paramètres de fermentation obtenus sont présentés dans le tableau 4.8.

Nous notons que la croissance de *L. plantarum* A6 sur milieu MRS glucose est tout à fait comparable à celle de *L. plantarum* Lacto Labo, (cf. § 4.1.3.1). Le taux de croissance ($0,43 \text{ h}^{-1}$) et la productivité en biomasse ($0,78 \text{ g/l.h}$) sont légèrement plus faibles que ceux obtenus pour la souche Lacto Labo, mais les rendements en biomasse ($Y_{x/s}$) et en lactate ($Y_{p/s}$) sont sensiblement identiques. Ainsi, la souche ne semble pas présenter d'exigences nutritionnelles spécifiques différentes de celles de Lacto Labo, ce qui permet d'envisager sa production massive. Soulignons qu'aucune production notable d'amylase n'a pu être mise en évidence au cours de cette fermentation, en présence de glucose.

Sur MRS amidon (fig. 4.8), la souche *L. plantarum* A6 conserve un taux de croissance élevé et les mêmes rendements de production en biomasse et en lactate. La quantité d'amylase synthétisée en fin de fermentation est de $3,3 \text{ U.I./ml}$, près de 50% de l'activité amylolytique sont produits pendant la phase de ralentissement de la croissance. La vitesse d'hydrolyse de l'amidon est supérieure à sa vitesse d'assimilation, ce qui conduit à l'apparition d'un pic de maltose pouvant atteindre 3 g/l à la septième heure de fermentation (résultat non montré). La vitesse d'hydrolyse de l'amidon n'apparaît donc pas comme un facteur limitant de la vitesse de croissance du microorganisme.

Nous pouvons observer, à partir des cinétiques sur MRS amidon + glucose (fig. 4.9), que la synthèse d'amylase intervient juste avant épuisement du glucose dans le milieu. Le seuil de répression de la synthèse de l'enzyme par le glucose peut ainsi être estimé à 5 g/l . En dessous de ce seuil, la production d'enzyme est extrêmement rapide et coïncide avec une diminution importante de la concentration en amidon dans le milieu. Durant les quatre premières heures de la fermentation, une hydrolyse très lente de l'amidon est cependant observée qui représente 14% de la quantité initiale en amidon. Aucune production d'amylase n'ayant été observée pendant cette phase, cette faible disparition d'amidon pourrait alors être attribuée à la présence dans le milieu, d'une quantité minimale d'enzyme (non détectée), initialement présente dans l'inoculum. La concentration en amylase à la fin de la fermentation ($4,3 \text{ U.I./ml}$) est sensiblement supérieure à celle obtenue sur MRS amidon.

L'ensemble des résultats obtenus confirme la forte capacité amylolytique de *L. plantarum* A6. Par ailleurs, ils mettent en évidence un phénomène de répression de la biosynthèse de l'amylase par le glucose.

Résultats et discussion

Tableau 4.8 : Paramètres de fermentation de *L. plantarum* (Lacto Labo) et *L. plantarum* A6 cultivés sur différents milieux.

Souche de <i>L. plantarum</i> étudiée	Milieu	μ (h ⁻¹)	Y _{x/s} (g/g)	Y _{p/s} (g/g)	Productivité en biomasse (g/l.h)
Lacto Labo	MRS glucose	0,57 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,75 ± 0,04	1,05
A6	MRS glucose	0,43 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,81 ± 0,1	0,78
A6	MRS amidon	0,45 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,75 ± 0,1	0,63
A6	MRS glucose+amidon	0,41 ± 0,06	0,19 ± 0,02	0,74 ± 0,06	0,71

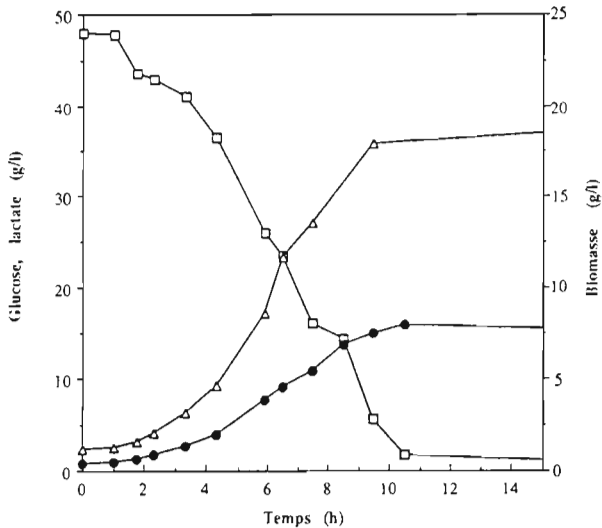


Figure 4.7 : Fermentation de *L. plantarum* A6 sur MRS glucose. □ , glucose ; Δ , lactate ; ● , biomasse.

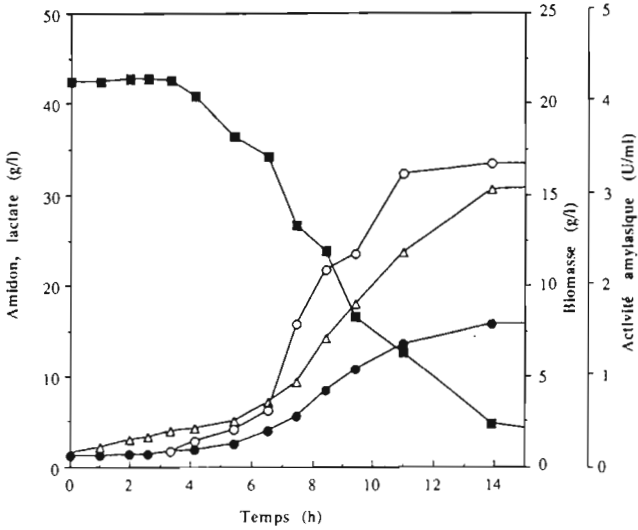


Figure 4.8 : Fermentation de *L. plantarum* A6 sur MRS amidon. ■ , amidon ; Δ, lactate ; ●, biomasse ; ○, activité amyliasique.

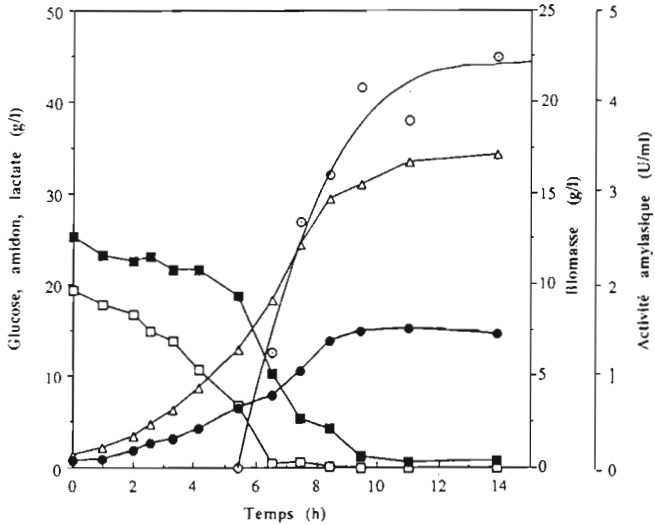


Figure 4.9 : Fermentation de *L. plantarum* A6 sur MRS glucose+ amidon. □ , glucose ; ■ , amidon ; Δ, lactate ; ●, biomasse ; ○, activité amyliasique.

4.2.4 - Caractérisation de l'amylase de *L. plantarum* A6

4.2.4.1 - Identification du type d'amylase

Il fallait tout d'abord identifier le type d'amylase excrétée par *L. plantarum* A6. En effet, plusieurs types d'amylases sont décrites (BARMAN, 1969) :

- l' α -amylase (EC 3.2.1.1) qui hydrolyse spécifiquement la liaison α -1,4 entre deux résidus de glucose dans les polyglucosides. L'enzyme doit reconnaître une séquence minimale de trois résidus glucose pour se fixer sur la chaîne. L' α -amylase est une endoenzyme : elle attaque la chaîne de façon aléatoire. Ses substrats "naturels" sont l'amidon et le glycogène.

- la β -amylase (EC 3.2.1.2) qui est une exoenzyme : elle agit par récurrence en hydrolysant les liaisons α -1,4 à partir des extrémités non réductrices des chaînes, et libère uniquement du maltose. Elle n'est pas capable d'hydrolyser la liaison α -1,6. La chaîne glucosidique doit avoir une taille minimale de 4 résidus.

- la glucoamylase (EC 3.2.1.3) qui est aussi une exoenzyme : elle agit par récurrence en hydrolysant les liaisons α -1,4 à partir des extrémités non réductrices des chaînes, et libère du glucose. Elle peut aussi hydrolyser le maltose et les liaisons α -1,6 des chaînes d'amylopectine.

Mesure de l'activité amylasique

L'activité amylasique peut être estimée par la mesure de la vitesse initiale de disparition de l'amidon par le dosage à l'iode, méthode 1 (OTENG-GYANG, 1979), ou d'apparition des sucres réducteurs par le dosage au DNS, méthode 2 (LINDGREN et REFAI, 1984).

Une comparaison de ces deux méthodes permet de différencier une α -amylase, d'une exoenzyme (β -amylase ou glucoamylase). En effet, d'après ROBYT et WHELAN (1973), l'hydrolyse de l'amidon par une endoenzyme (type α), entraîne une diminution rapide de la coloration de l'amidon à l'iode mais produit lentement des sucres réducteurs. A l'opposé, THOMAS *et al.* (1980) ont montré que l'attaque de l'amidon par une exoamylase (type β) est accompagnée d'une élévation importante du pouvoir réducteur du mélange réactionnel, mais a peu d'effet sur la coloration du substrat à l'iode.

Ainsi, nous avons comparé, à partir de l'hydrolyse de l'amidon sous l'action de l'amylase de *L. plantarum* A6, les cinétiques de disparition de la coloration de l'amidon à l'iode et les cinétiques d'apparition des sucres réducteurs (exprimées en équivalents glucose) (cf. fig. 4.10).

Les résultats obtenus montrent que la vitesse initiale de disparition de l'amidon est 7 à 8 fois plus élevée que la vitesse d'apparition des sucres réducteurs. Ce résultat, typique d'une attaque endoenzymatique, suggère que l'amylase de *L. plantarum* A6 est de type α .

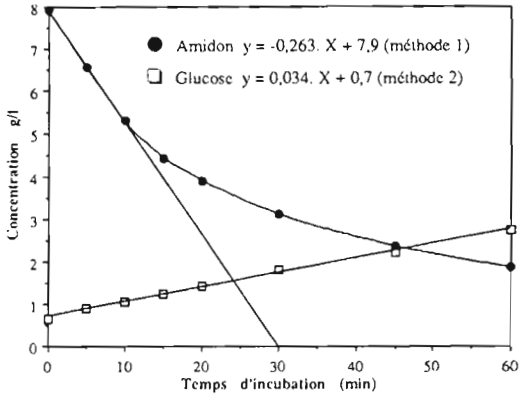


Figure 4.10 : Vitesses de disparition de la coloration à l'iode de l'amidon et d'apparition des sucres réducteurs.

Par ailleurs, il apparaît que la détermination de cette activité amylasique par la mesure de la vitesse de disparition de l'amidon, est la méthode la plus sensible. De plus, elle s'avère être la méthode la plus simple. C'est donc cette dernière que nous avons retenue pour la suite de notre étude.

Analyse par HPLC des produits de dégradation de l'amidon

Pour compléter l'étude de la caractérisation du type d'amylase synthétisée par *L. plantarum* A6, nous avons comparé les profils chromatographiques obtenus en HPLC après avoir fait agir sur l'amidon, d'une part, le sumageant d'une culture de *L. plantarum* A6 et d'autre part, des enzymes amylolytiques du commerce (α -amylase d'*Aspergillus niger*, Sigma A3514 ; β -amylase de pomme de terre, Sigma A7005 et amyloglucosidase d'*Aspergillus oryzae* Sigma A0273).

Les profils d'élution (cf. fig. 4.11) montrent que :

- l' α -amylase (graphe B) est caractérisée par la production de glucose et de maltose en grande quantité. Par ailleurs, nous observons également la présence d'un pic à 5,2 min correspondant certainement à un ou plusieurs oligosaccharides résiduels. L' α -amylase n'hydrolysant pas la liaison α -1,6, ces oligosaccharides sont probablement des dextrines limites dont les chaînes aux extrémités "libres" peuvent avoir jusqu'à 6 résidus glucose.

- la glucoamylase (graphe C) est caractérisée par la production de glucose uniquement. Il reste très peu d'oligosaccharides car cette enzyme peut couper toutes les liaisons entre les résidus glucose dans les chaînes d'amylose et d'amylopectine de l'amidon.

- la β -amylase (graphe D) produit principalement du maltose, peu de dextrines limites et très peu de glucose.

Résultats et discussion

L'observation du graphe A, montre que l'amylase produite par *L. plantarum* A6 hydrolyse l'amidon en formant du maltose, du glucose et des dextrines limites, ce qui est caractéristique des α -amylases et confirme les résultats précédemment obtenus.

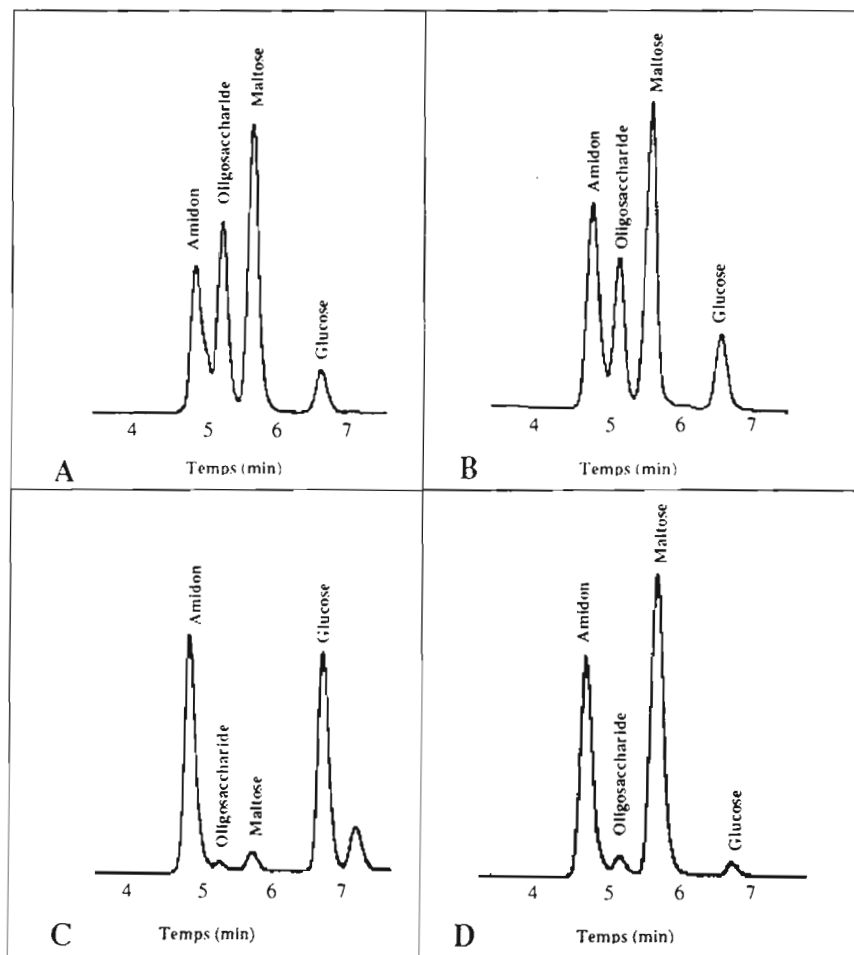


Figure 4.11 : Analyse par HPLC des produits de dégradation de l'amidon sous l'action de différents enzymes après 1h d'incubation à 30°C.

A : amylase de *Lactobacillus plantarum* A6 ; B : α -amylase d'*Aspergillus niger* ;
C : glucoamylase d'*Aspergillus oryzae* ; D : B-amylase de pomme de terre.

4.2.4.2 - Influence de la source de carbone sur la production d'amylase

Afin de déterminer le substrat carboné permettant une production maximale d'amylase, l'activité enzymatique a été mesurée après culture sur différents substrats.

Après croissance pendant 20 heures en fioles à 30°C, l'activité amylasique a été mesurée sur les surnageants de culture. Chaque milieu a étéensemencé à partir d'une préculture réalisée sur un milieu de composition identique. Des essais ont été réalisés en parallèle en ajoutant du carbonate de calcium dans le milieu de culture (20 g/l). Le carbonate forme, avec l'acide lactique excrété par les cellules, du lactate de calcium, ce qui ralentit l'acidification du milieu.

Les résultats obtenus sont présentés figure 4.10. Il est important de souligner que l'ensemble des sucres testés, permettent une croissance importante et comparable (DO finales à 540 nm comprises entre 5 et 6).

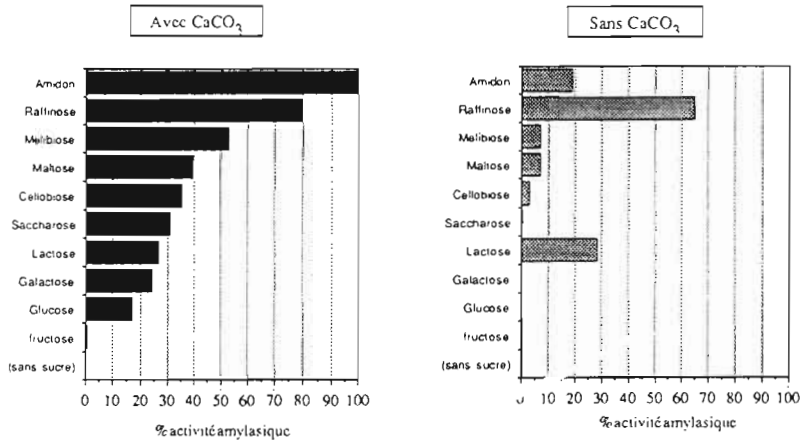


Figure 4.10 : Production d'amylase par *L. plantarum* A6 cultivé sur différents glucides, avec ou sans CaCO₃. Activités exprimées en % de l'activité maximale mesurée (Amidon + CaCO₃)

L'activité amylasique maximale a été obtenue en présence d'amidon (substrat naturel de l'enzyme) et de CaCO₃. En présence de CaCO₃, les taux de production d'enzymes s'ordonnent en fonction des degrés de polymérisation des glucides testés : l'amidon (polymère) et le raffinose (triose) entraînent les plus fortes activités. On trouve ensuite tous les diosides puis les glucides simples. Les taux de production d'amylase par les mono et diosides restent cependant assez faibles (20 à 40% de l'activité observée sur amidon), sauf dans le cas du mélibiose (environ 53%).

Notons que sur le milieu MRS glucose en présence de CaCO_3 , une faible activité amylasique est mesurée (14% de l'activité maximum), alors que précédemment en bioréacteur aucune activité notable n'avait été décelée (cf. § 4.2.2). Ceci peut s'expliquer par la technique de dosage de l'activité amylasique (vitesse d'apparition des sucres réducteurs) utilisée au cours de l'étude en bioréacteur, cette technique s'étant avérée beaucoup moins sensible.

Outre l'amidon, les trois glucides les plus efficaces (raffinose, mélibiose et maltose), contiennent tous une séquence de deux hexoses (glucose ou galactose) sous forme furanique. La liaison glucidique entre ces deux résidus est de type α , donc de structure proche du substrat naturel de l'enzyme. Cependant, les deux premiers contiennent des liaisons glucidiques α 1-6, ce qui ne correspond pas au principal type de liaison présent dans l'amidon (α 1-4).

D'autre part, en absence de CaCO_3 , les quantités d'amylase obtenues sont beaucoup plus faibles. Ce résultat peut être lié à une dénaturation de l'enzyme à des pH plus acides ou à la présence dans les milieux contenant du CaCO_3 , d'ions Ca^{2+} indispensables au fonctionnement de l'enzyme, les α -amylases bactériennes étant toutes définies en effet comme des métalloenzymes présentant du calcium dans leur site actif (FISCHER et STEIN, 1960). En absence de CaCO_3 , le profil du taux d'enzyme synthétisée en fonction du substrat carboné n'est pas comparable à celui obtenu en présence de CaCO_3 . En effet, c'est le raffinose qui permet la plus forte production d'enzyme (60% de l'activité de référence), alors que peu d'enzyme a été synthétisée avec l'amidon. De plus, on peut remarquer que le lactose a induit une production similaire d'enzyme et qu'aucune production notable d'amylase n'a été observée en présence de glucides simples.

L'interprétation des résultats doit être faite avec précaution, car les conditions de culture utilisées n'ont pas été contrôlées, en particulier le pH. Ils nous permettent néanmoins de suggérer que la biosynthèse de l'enzyme est plus ou moins réprimée quand la source de carbone utilisée est facilement métabolisable. L'utilisation d'une source de carbone plus complexe, de type disaccharides, trisaccharides ou polysaccharides entraînerait une production supérieure d'enzyme. Ces résultats sont en accord avec ceux de SEN et CHAKRABARTY (1984) qui observent chez *L. cellobiosus* un effet stimulateur du Ca^{2+} sur la synthèse d'amylase ainsi que des niveaux plus importants de production quand la source de carbone utilisée est complexe. La culture, à pH contrôlé en présence d'amidon et de CaCl_2 , devrait ainsi permettre la plus forte production d'enzyme.

4.2.4.3 - Influence du pH et de la température sur l'activité amylasique

Les conditions de température et de pH utilisées jusqu'à présent avaient été choisies à partir des conditions optimales déterminées par LINDGREN et REFAI (1984) pour l'amylase d'une bactérie lactique isolée à partir de poisson fermenté. Il nous a paru intéressant d'étudier l'influence de ces deux facteurs sur l'activité α -amylasique de *L. plantarum* A6, contenue dans l'extrait brut, afin de pré-caractériser l'enzyme.

L'influence du pH a été testée dans une gamme variant de 2,5 à 8 (fig. 4.13). L'activité maximale de l'enzyme est observée à pH 5, et 70% de l'activité est retrouvée à pH 4.

L'influence de la température a été testée dans une gamme de température variant de 10 à 80°C (cf. fig. 4.14). Dans les conditions étudiées, la température optimale pour l'amylase est de 55°C. A 30°C, température habituelle de fermentation du manioc, on retrouve 60% de l'activité.

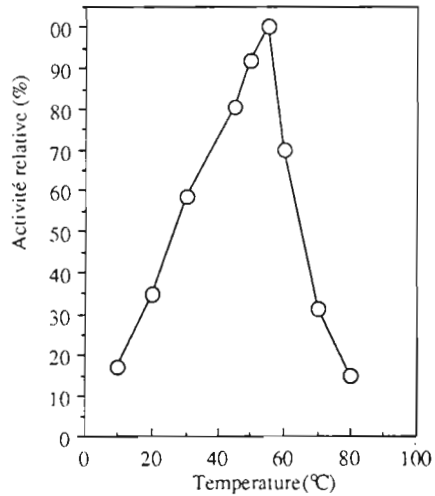
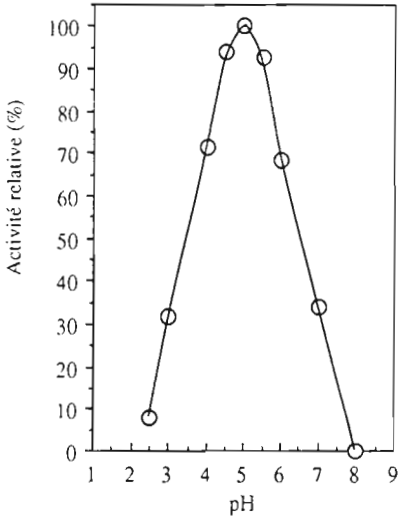


Figure 4.13 : Influence du pH sur l'activité amylasique de *L. plantarum* A6 à 40°C.

Figure 4.14 : Influence de la température sur l'activité amylasique de *L. plantarum* A6 à pH 5.

4.2.5 - Conclusion

Nous avons pu isoler à partir de racines de manioc fermentées, une souche sauvage de *L. plantarum* amylolytique. L'enzyme synthétisée a été identifiée comme étant une α -amylase. Une étape supplémentaire de purification s'avère cependant nécessaire afin de s'assurer que l'activité mesurée n'est pas associée à d'autres types d'activités amylasiques (glucoamylase et β -amylase). Il faut noter que seule une activité de type α -amylasique a été décrite dans la bibliographie chez les bactéries lactiques amylolytiques.

L'étude des propriétés physico-chimiques de l'enzyme synthétisée a montré que celle-ci est extracellulaire et acido-tolérante. L'enzyme conserve ainsi près de 70% de son activité à pH 4, niveau d'acidité retrouvé à partir du troisième jour de rouissage dans les racines de manioc (OKAFOR *et al.*, 1984). Ces propriétés semblent différentes de celles observées chez d'autres bactéries lactiques amylolytiques. En effet, le caractère extracellulaire est retrouvé chez *L. cellobiosus* (SEN et CHAKRABARTY, 1986) mais les profils d'activité en fonction de la température et du pH de ce microorganisme sont différents de ceux observés pour *L. plantarum* A6. Deux bactéries lactiques amylolytiques du genre *Lactobacillus*, isolées de l'intestin de poulet par CHAMP *et al.* (1983), possèdent par contre des profils comparables, mais l'amylase synthétisée par ces deux microorganismes reste liée à la cellule.

La croissance de ce microorganisme a été étudiée en fermenteur. Les résultats obtenus sont particulièrement intéressants (fort rendement en biomasse, taux de croissance élevé, conversion de l'amidon en lactate), et nous permettent d'envisager l'utilisation de cette souche comme starter des aliments fermentés à base de manioc. Cependant, le choix de ce microorganisme, produisant un mélange racémique des formes D(-) et L(+) lactate, peut-être critiquable sur le plan nutritionnel. En effet, l'acide D(-) lactique n'est pas métabolisable par l'homme : sa présence n'est donc pas souhaitable ; d'après les recommandations de la FAO, son ingestion journalière ne devrait pas dépasser 100 mg/kg de poids. La sélection par les techniques de biologie moléculaire d'un mutant de la souche *L. plantarum* A6 déficiente en activité D(-) lactate déshydrogénase (enzyme responsable de la formation d'acide D(-) lactique à partir du pyruvate), pourrait apporter une solution à ce problème.

En résumé, cette bactérie lactique s'avère particulièrement intéressante, non seulement d'un point de vue taxonomique, mais aussi pour sa capacité à se développer rapidement et massivement en présence de milieux à base d'amidon .

4.3 - Purification et caractérisation de l' α -amylase de *L. plantarum* A6

4.3.1 - Introduction

Comme nous l'avons précédemment noté, très peu de bactéries lactiques ont été reportées pour leur capacité à métaboliser l'amidon. Par ailleurs, les caractéristiques des enzymes amylolytiques de ces microorganismes ont été très peu décrites. A notre connaissance, seuls les travaux de SEN et CHAKRABARTY (1986) et ceux de LINDGREN et REFAI (1984) relatent la caractérisation d'une activité amylolytique produite par une bactérie lactique.

La souche de *L. plantarum* A6 que nous avons isolée du manioc roui pour sa capacité à dégrader l'amidon, présente de nombreux intérêts. C'est à notre connaissance la seule souche de *L. plantarum* amylolytique décrite dans la littérature à ce jour. Par ailleurs, ce microorganisme synthétise une α -amylase extracellulaire en grande quantité telle que les cinétiques de sa croissance sur un milieu à base de glucose ou d'amidon sont comparables.

Etant donné les caractéristiques originales de ce microorganisme et le peu d'études effectuées sur les activités amylolytiques des bactéries lactiques, il nous a paru nécessaire d'étudier plus en détail cette activité enzymatique. Ainsi, le présent chapitre décrit la purification et la caractérisation de l'activité amylasique extracellulaire de *L. plantarum* A6.

4.3.2 - Purification

La purification de l' α -amylase de *L. plantarum* A6 a été réalisée à partir du surnageant d'une culture sur milieu MRS-amidon obtenue en fermenteur de 1,5 litres, à pH et agitation contrôlés. Compte tenu des observations rapportées au § 4.2.3.1, du chlorure de calcium a été ajouté dans le milieu à une concentration de 0,5 g/l. La culture a été stoppée lorsque l'activité amylasique était maximale, c'est à dire à la fin de la phase de croissance, après 11 h de culture.

La purification de l'amylase de *L. plantarum* A6 a été réalisée en trois étapes :

- précipitation fractionnée des protéines au sulfate d'ammonium,
- ultrafiltration,
- chromatographie d'échange d'anions (DEAE-Cellulose).

Les résultats et les bilans de purification sont résumés dans le tableau 4.9.

Tableau 4.9 : Bilan de la purification de l'amylase de *L. plantarum* A6

Etape de purification	Volume (ml)	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité Spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Sumageant filtré	750	82,5	35100	425	100	1
Précipitation fractionnée (fraction 50-70%)	39	18,1	25935	1433	73,9	3,4
Ultrafiltration	8,8	10,4	16016	1540	45,6	3,6
DEAE-Cellulose (fractions 117-130)	61,8	1,5	12484	8270	35,6	19,5

Au cours de l'étape de précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, l'activité amylasique a été précipitée pour des concentrations comprises entre 50 et 70% de saturation. Cette première étape nous a permis d'obtenir un bon rendement de récupération (74%) ainsi qu'une bonne concentration de l'enzyme.

L'étape d'ultrafiltration a été réalisée, afin de concentrer l'extrait protéique et d'éliminer les ions NH_4^+ et SO_4^{2-} rajoutés lors de la précipitation fractionnée, qui peuvent gêner la fixation de l'enzyme sur la colonne de DEAE-Cellulose. Environ 30% de la quantité initiale d'enzyme ont été perdus au cours de cette étape sans pour autant améliorer la pureté de l'enzyme.

Une étape supplémentaire de purification a été effectuée par chromatographie sur colonne de DEAE-Cellulose. Le profil d'élution (cf. fig. 4.15) révèle un seul pic d'activité amylasique. L'essentiel de l'activité est élué pour une concentration en NaCl comprise entre 0,44-0,55 M. Le coefficient final de purification est proche de 20 avec un rendement de récupération de 35 %. Les fractions 117 à 130 présentant le maximum d'activité amylasique ont été rassemblées, dialysées une nuit contre du tampon phosphate 0,05 M ; pH 6,8 et conservées à -30°C. Elles constituent la fraction purifiée qui a été utilisée par la suite, pour la caractérisation de l'activité enzymatique. Il est à noter, à ce niveau, qu'aucune perte notable d'activité n'a été observée dans de telles conditions de conservation, après au moins 6 mois.

Analyse électrophorétique des échantillons obtenus à chaque étape de purification

La pureté de l'enzyme, de même que l'efficacité du protocole de purification utilisé, ont été appréciées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives. Pour cela, deux techniques de révélation ont été utilisées (cf. photo 4.3) : coloration des protéines totales au nitrate d'argent, et mise en évidence de l'activité amylasique par révélation au lugol après incubation du gel dans un tampon contenant de l'amidon. Les échantillons protéiques, correspondant aux différentes étapes de purification, ont été chargés sur le gel de façon à déposer une activité amylasique constante (7 U/puits).

Résultats et discussion

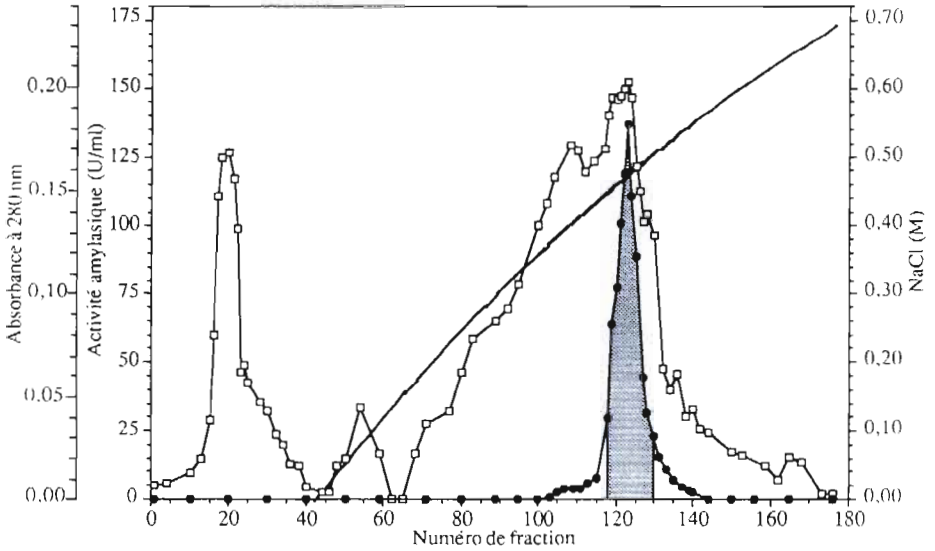


Figure 4.15 : Profil d'éluion de la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Cellulose de l'extrait enzymatique obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium et ultrafiltration.

□, absorbance à 280 nm ; ●, activité amylasique ; — : NaCl.

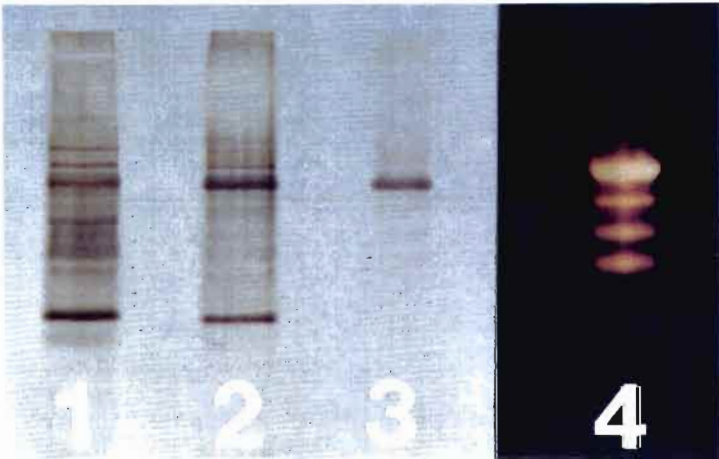


Photo 4.3 : Analyse par électrophorèse non dénaturante des extraits enzymatiques issus de différentes étapes de la purification.

Révélation des protéines totales au nitrate d'argent. Piste A: extrait brut ; piste B : après précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium ; piste C : après chromatographie DEAE Cellulose (extrait purifié)

Mise en évidence de l'activité amylasique Piste D : extrait purifié.

Résultats et discussion

La grande sensibilité de la technique de coloration au nitrate d'argent, choisie ici pour révéler les protéines, permet d'apprécier l'efficacité du protocole suivi pour purifier cette activité enzymatique (cf. photo 4.4).

Au niveau de la fraction purifiée (piste 3), nous avons mis en évidence une bande principale ainsi que trois autres sous-bandes de très faible intensité, régulièrement espacées. La révélation au lugol (piste 4) montre que l'activité amylasique est localisée au niveau de la bande principale, mais aussi, à une concentration moindre, au niveau des autres bandes mineures. Notons par ailleurs, que ces trois bandes mineures, avaient été observées initialement avec la même intensité, au niveau de l'extrait brut. Elles ne se sont donc pas formées durant la purification.

Il est important de souligner qu'un tel phénomène a déjà été observé lors de la caractérisation d' α -amylases synthétisées par d'autres microorganismes. En effet, SAITO (1973) a détecté pour l' α -amylase purifiée de *Bacillus licheniformis*, quatre bandes de protéines actives après électrophorèse sur gel de polyacrylamide, alors que l'enzyme présentait un seul pic d'activité après ultracentrifugation et chromatographie sur CM-Cellulose et Sephadex G-100. L'auteur a supposé que la souche produisait quatre amylases isoenzymes ou que ces formes multiples pouvaient être liées à un artefact survenant au cours du protocole d'isolement de l'enzyme. ROBYT et ACKERMAN (1973) ont également observé la présence de formes multiples pour l' α -amylase de *Bacillus subtilis*. Après une étude détaillée des propriétés de cette enzyme, ils ont pu mettre en évidence que l'enzyme purifiée était susceptible de s'agréger en formant des complexes ayant un poids moléculaire de plus en plus élevé. Dans ce cas, le zinc est responsable ce phénomène.

A partir de ces différentes observations, deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer, dans notre cas, l'existence de ces bandes multiples présentant une activité amylasique :

a) l'extrait purifié est constitué d'une population d'enzymes identiques susceptibles de s'agréger

b) dans les conditions utilisées, la souche synthétise plusieurs isoenzymes présentant une activité amylolytique.

Par ailleurs, nous pouvons aussi envisager que *Lactobacillus plantarum* A6 excréterait dans le milieu une activité protéasique pouvant entraîner une protéolyse de l'enzyme amylolytique avec conservation du site actif et conduisant à des polypeptides de poids moléculaire légèrement inférieurs. Les amylases bactériennes sont de plus reconnues pour être en général très résistantes à la protéolyse (FISCHER et STEIN, 1960).

En l'état actuel, les résultats obtenus ne nous permettent pas de retenir préférentiellement une de ces différentes hypothèses sans avoir étudié plus précisément les propriétés des enzymes de chaque bande.

4.3.3 - Caractérisation de l'enzyme purifiée

4.3.3.1 - Estimation du poids moléculaire

Le poids moléculaire de l'enzyme sous sa forme native n'a pu être déterminé, la quantité de matériel récupéré après chromatographie sur DEAE-Cellulose étant trop faible pour réaliser une chromatographie sur gel filtration. Cependant, nous avons pu estimer son poids moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS- PAGE).

La révélation au nitrate d'argent a mis en évidence deux bandes uniquement. La première bande est parfaitement définie et correspond à un poids moléculaire de 50 kDa, la seconde bande plus diffuse, a un poids moléculaire proche de 150 kDa. Les mêmes profils électrophorétiques ont été obtenus en présence ou en absence de β -mercaptoéthanol (résultats non montrés).

Notons qu'aucune des amylases bactériennes décrites dans la littérature n'a un poids moléculaire aussi élevé, le plus haut poids moléculaire rapporté pour une α -amylase étant de 92 kDa pour *Bacteroides amylophilus* (FOGARTY, 1983). La plupart des α -amylases ont un poids moléculaire proche de 50 kDa (FISCHER et STEIN, 1960 ; FOGARTY, 1983), ce qui correspond au poids d'une des bandes observées. Cependant, il a été décrit que l' α -amylase purifiée de *Bacillus subtilis* pouvait former en SDS-PAGE, des agrégats pouvant atteindre de 125 à 400 kDa, suivant les conditions opératoires. La bande diffuse de poids moléculaire proche de 150 kDa pourrait ainsi correspondre à des agrégats de la protéine de 50 kDa. Cette dernière observation serait plus en faveur de la première hypothèse proposée au paragraphe précédent (agrégation).

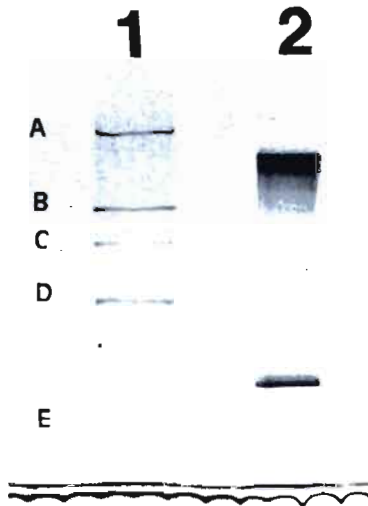


Photo 4.4 : Électrophorèse en conditions dénaturantes de l'amylase purifiée et des marqueurs de poids moléculaire. Piste A : gamme étalon de protéines. Piste B : extrait purifié.

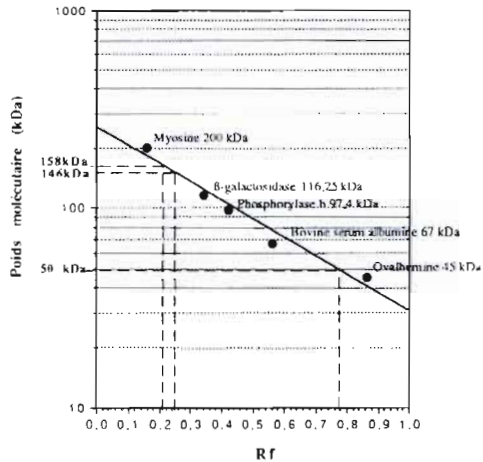


Figure 4.16 : Droite d'étalonnage du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Détermination du poids moléculaire de l'amylase de *L. plantarum* A6

4.3.3.2 - Influence du pH

Détermination du pH optimum

L'influence du pH sur l'activité amylasique, a été testée à une température de 55°C, dans une gamme de pH allant de 3 à 7,5, en utilisant des tampons citrate/phosphate 0,1 M. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 4.17

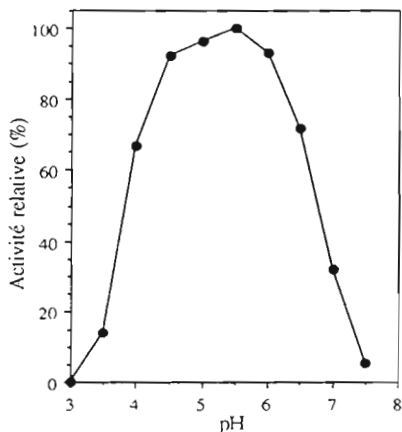


Figure 4.17 : Influence du pH sur l'activité de l'amylase purifiée de *L. plantarum* A6 (55°C).

Le profil obtenu est assez proche de celui présenté sur la figure 4.13 pour l'extrait brut. L'enzyme agit préférentiellement à pH acide et présente un optimum à pH 5.5. Pour des pH compris entre 4.5 et 6, la perte d'activité n'excède pas 10 à 15%. Au delà, elle chute rapidement et devient nulle pour des valeurs de pH proches de 3 et 8.

Notons que la valeur du pH optimum déterminée pour l'amylase de *L. plantarum* A6 (pH 5.5), se situe dans la gamme des pH optimum (entre 4,8 et 6,5) habituellement rapportée pour les α -amylases microbiennes (FOGARTY, 1983).

Influence du tampon sur l'activité amylase

L'influence de la nature du tampon a été déterminée à pH 5,5 pour une concentration de 0,1 M. L'activité obtenue avec le tampon citrate/phosphate a été retenue comme activité de référence. Les résultats, résumés dans le tableau 4.10, montrent qu'il n'y a pas d'influence notable de la nature du tampon sur l'activité amylasique.

Résultats et discussion

Tableau 4.10 : Influence de la nature du tampon sur l'activité amylasique de *L. plantarum* A6

Tampon	Activité amylase relative
Citrate-phosphate	100% (référence)
Acétate	105%
Maléate	101%
Succinate	105%
Phosphate	100%
Citrate	95%
Cacodylate	107%

Stabilité de l'enzyme en fonction du pH

L'analyse de l'influence du pH sur l'activité amylasique, a été complétée par l'étude de la stabilité de l'enzyme à 30°C (température de fermentation du manioc) dans des tampons citrate/phosphate 0,1 M aux trois pH suivants : 3,8 ; 5,5 et 6,2. Les pH 6,2 et 3,8 ont été étudiés en plus du pH optimum, car ce sont les pH rencontrés respectivement au début et à la fin de la fermentation de la pulpe de manioc lors de la production de gari (VASCONCELOS *et al.*, 1990). L'évolution de l'activité a été suivie sur 5 jours, période correspondant à la durée de fermentation du manioc.

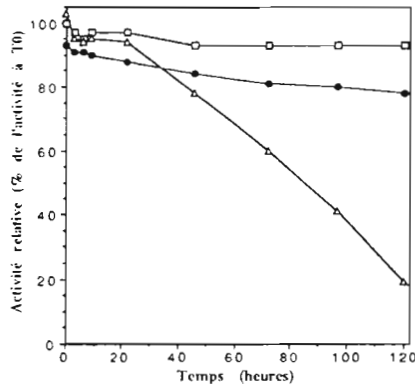


Figure 4.18 : Etude de la stabilité à 30°C de l'amylase de *L. plantarum* A6 à différents pH
 Δ : pH 3,8 ; □ : pH 5,5 ; ● : pH 6,2

Nous constatons (cf. fig. 4.18) qu'à pH 5,5, l'enzyme présente la meilleure stabilité car seulement 5% de perte d'activité sont mesurés après 5 jours d'incubation. A pH 6,2, l'activité enzymatique est relativement stable car elle ne subit qu'une perte de 15% d'activité. Enfin, à pH 3,8, l'enzyme est très peu stable. L'activité reste constante sur les 24 premières heures, puis une baisse régulière est observée pour atteindre 20% de l'activité initiale après 5 jours.

4.3.3.3 - Influence de la température

L'influence de la température sur l'activité amylasique a été étudiée dans une gamme de température allant de 10 à 80°C, en utilisant du tampon citrate/phosphate 0,1 M à pH 5,5. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure suivante :

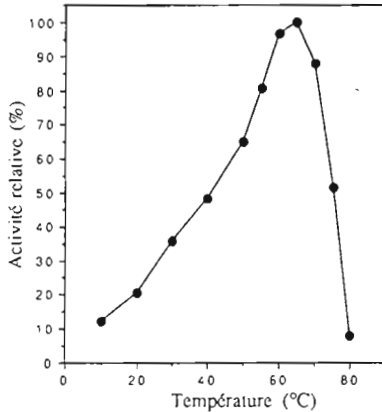


Figure 4.19 : Influence de la température sur l'activité amylasique de *L. plantarum* A6 (pH 5,5)

Le profil d'activité (figure 4.19) montre un optimum à 65°C. Au delà de cette température, l'activité chute très rapidement. Il est fréquent de trouver des amylases bactériennes dont l'activité maximum se situe entre 50 et 70°C (FOGARTY, 1983). Notons que la température optimale déterminée sur l'extrait brut était de 55°C (cf. § 4.2.3.3). Cet écart pourrait être attribué à l'utilisation d'un pH plus acide (pH 5) pour la mesure sur l'extrait brut.

Calcul de l'énergie d'activation

L'énergie d'activation a été calculée à partir des données correspondant à la figure 4.19 et à l'aide de l'équation d'Arrhénius:

$$\frac{d(\ln V)}{d(1/T)} = -\frac{E_a}{R} = -p$$

Avec:

Ea: Energie d'activation de la réaction (J/Mol ou cal/Mol)

R: Constante des gaz parfaits (J/Mol.K ou cal/Mol.K)

V: Vitesse de la réaction ou activité ou activité relative

T: Température (K)

p: pente de la partie linéaire du graphe représenté figure 4.19

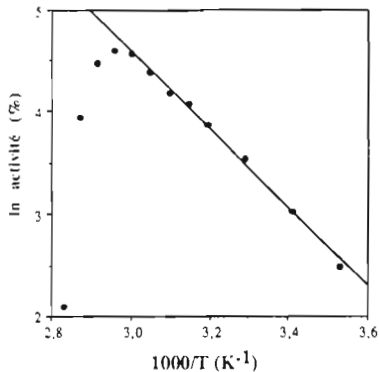


Figure 4.20 : Représentation d'Arrhénius de l'effet de la température sur l'activité amylasique de *L. plantarum* A6.

La relation est linéaire entre 10 et 60°C ; au delà, la dénaturation de l'enzyme se traduit par une déviation par rapport à la droite. L'énergie d'activation de la réaction, calculée entre 10 et 60°C, est de 7.34 kcal/Mol soit 30,9 kJ/Mol.

4.3.3.4 - Détermination des paramètres cinétiques

Nous avons observé que le profil de la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon en fonction de la concentration en substrat, a une allure hyperbolique. Il s'agirait donc d'une enzyme de type Michaelien.

Les paramètres cinétiques (vitesse maximale et constante de Michaelis) de l'activité amylasique purifiée de *L. plantarum* A6 ont été déterminés à 65°C (température optimale de l'enzyme) et à 30°C (température optimale de croissance de *L. plantarum* A6), en utilisant différentes concentrations en amidon soluble.

Les variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat, exprimées selon les méthodes de Hanes-Woolf et de Lineweaver-Burck sont respectivement présentées sur les figures 4.21 et 4.22. Le tableau 4.11 regroupe les résultats obtenus.

Tableau 4.11 : Paramètres cinétiques de l'amylase de *L. plantarum* A6 à pH 5.5 à 30 et 65°C

	30°C	65°C
K_m (g/l)	3,94	2,38
V_{max} (g/l.min)	0,28	0,96

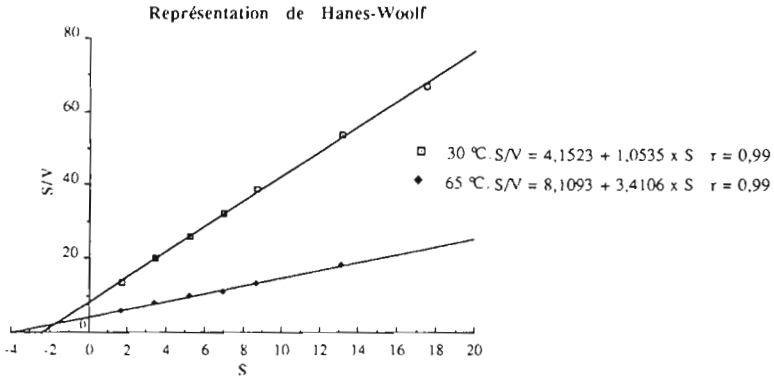


Figure 4.21 : Détermination des K_m de l'amylase sur amidon à 30°C et 65°C.

S: concentration en substrat en g/l ; V: vitesse de la réaction en g/l.min

à 30°C : $K_m = 4,152 / 1,054 = 3,94$ g/l

à 65°C : $K_m = 8,109 / 3,411 = 2,38$ g/l

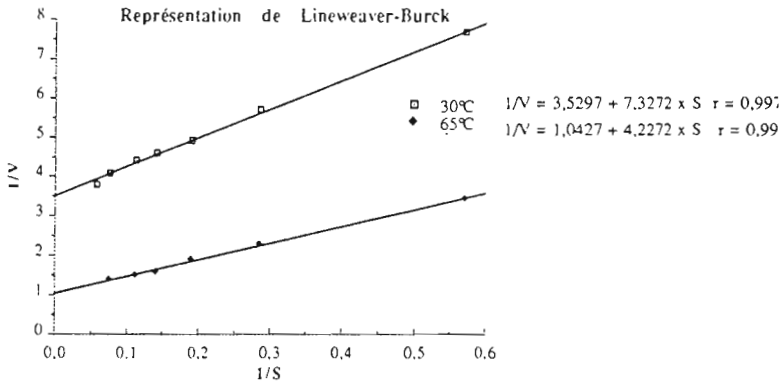


Figure 4.22 : Détermination des V_{max} de l'amylase sur amidon à 30°C et 65°C.

S: concentration en substrat en g/l ; V: vitesse de la réaction en g/l.min

à 30°C : $V_{max} = 1 / 3,53 = 0,28$ g/l . min

à 65°C : $V_{max} = 1 / 1,04 = 0,96$ g/l . min

L'amylase présente une constante d'affinité (K_m) pour l'amidon qui se situe dans la gamme de valeurs habituellement rencontrées pour les amylases de différentes origines (homme, bactéries, champignons et levures) et mesurées sur différentes sortes d'amidon : 0,5 à 7 g/l (FISCHER et STEIN, 1960 ; BARMAN, 1969).

A 30°C, le K_m de l'amylase est 1,7 fois plus grand qu'à 65°C, ce qui traduit une plus forte affinité de l'enzyme pour l'amidon à 65°C. D'autre part, la vitesse maximale obtenue est environ 3,4 fois plus faible à 30°C qu'à 65°C. Ce rapport correspond à la différence d'activité mesurée lors de l'étude de l'effet de la température (cf. § 4.3.3.3).

4.3.3.5 - Effets des ions et d'autres effecteurs enzymatiques

Effets des anions

Après avoir vérifié l'absence d'effet de l'ion sodium sur l'activité amylasique, différents anions, sous forme de sels de sodium, ont été testés à une concentration de 0,01 M dans du tampon citrate/phosphate (pH 5,5), à 55°C. Les résultats présentés dans le tableau 4.12, révèlent que les anions testés n'ont pas d'influence notable sur l'activité amylasique de *L. plantarum* A6.

Tableau 4.12 : Influence de quelques anions sur l'activité amylasique de *L. plantarum* A6 à pH 5,5 et 55°C. Concentration des anions : 0,01 M. Témoin (sans anion) = 100%.

Anion	Activité amylase relative
Chlore (NaCl)	101%
Carbonate (Na ₂ CO ₃)	94%
Sulfate (Na ₂ SO ₄)	102%
Sulfite (Na ₂ SO ₃)	103%
Nitrate (NaNO ₃)	99%

Effets des cations

Les cations, testés à une concentration de 0,01 M, ont été apportés sous forme de chlorures ou sulfates, ces deux ions n'ayant montré précédemment, aucune influence sur l'activité enzymatique.

Les résultats rassemblés dans le tableau 4.13, montrent que l'enzyme est fortement inhibée par le mercure (Hg²⁺). Aucune autre influence notable (inhibition ou activation) n'a été observée avec les autres cations testés.

Tableau 4.13 : Influence de quelques cations sur l'activité amylasique de *L. plantarum* A6 à pH 5.5 ; 55°C. Concentration des cations : 0.01 M. Témoin (sans cation) = 100%.

Cation	Activité amylase relative
Barium (BaCl ₂)	103%
Cuivre (CuSO ₄)	109%
Magnésium (MgSO ₄)	104%
Cobalt (CoCl ₂)	100%
Nickel (NiCl ₂)	109%
Mercure (HgCl₂)	0%
Zinc (ZnSO ₄)	107%
Fer II (FeSO ₄)	93%
Calcium (CaCl ₂)	95%
Potassium (KCl)	114%
Fer III (FeCl ₃)	115%
Cadmium (CdN ₂ O ₆)	98%
Etain (SnCl ₂)	89%
Manganèse (MnCl ₂)	99%

Effets d'autres effecteurs enzymatiques

Certains effecteurs, dont les sites d'action sont représentés figure 4.23, ont été testés sur l'activité amylasique de *L. plantarum* A6. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 4.14. Notons que l'effet du DTT (dithiothreitol) permettant de mettre en évidence la présence de ponts disulfures n'a pu être testé. En effet, ce réactif ayant un pouvoir réducteur important, ne permet ni le dosage de l'amidon par l'iode, ni le dosage des sucres réducteurs par le DNS.

Tableau 4.14 : Influence de quelques effecteurs enzymatiques sur l'activité amylasique de *L. plantarum* A6 à pH 5.5 ; 55°C. Témoin : sans effecteur = 100%

Effecteur	Concentration (M)	Activité amylase relative
Amino-5-tétrazole monohydraté	10 ⁻²	112%
4-diméthylaminobenzaldéhyde	10 ⁻²	70%
Réactif de Woodward	10 ⁻²	102%
EDTA	10 ⁻²	91%
N-acétylacétone	10 ⁻²	100%
N-éthylmaléinimide	10 ⁻²	90%
2,5-diméthoxytétrahydrofurane	10 ⁻²	111%
Anhydride trifluoroacétique	10 ⁻²	89%
Acide acétique	10 ⁻²	82%
Iode	10 ⁻³	6%
Iode/tyrosine	10 ⁻³ /5.10 ⁻³	79%
N-bromosuccinimide	10 ⁻³	0%
N-bromosuccinimide/tryptophane	10 ⁻³ /5.10 ⁻³	79%

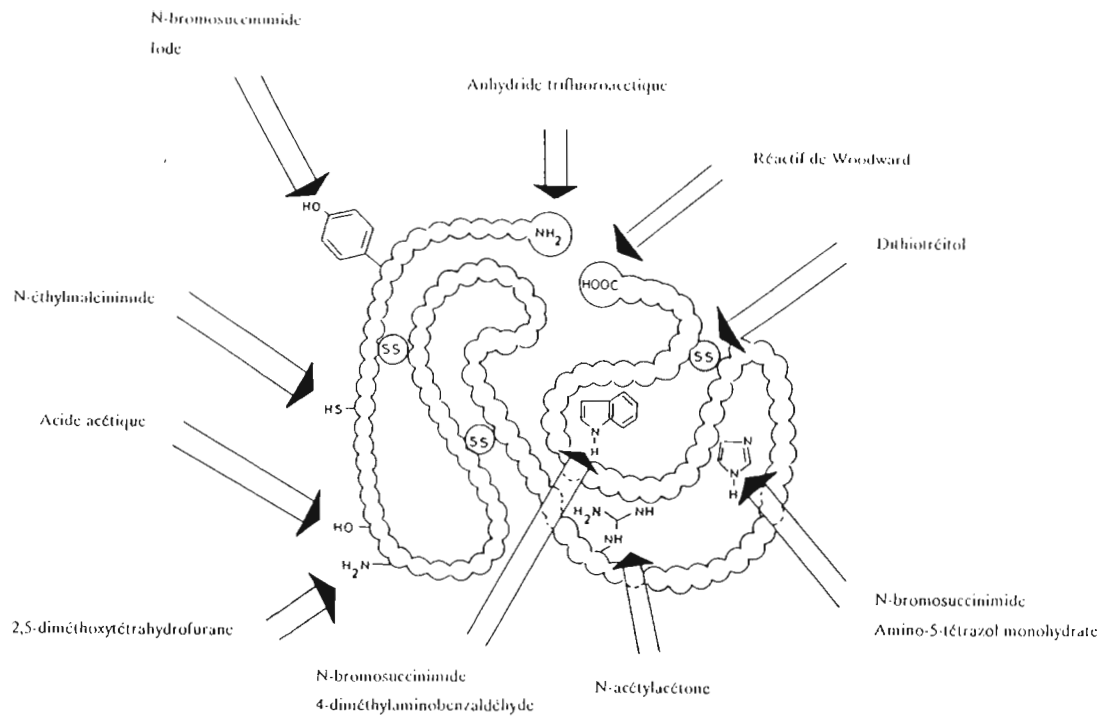



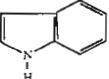

Figure 4.23 : Sites d'action de quelques effecteurs enzymatiques d'après VASSEROT. 1991.

Ces résultats nous permettent de tirer les conclusions suivantes (cf. tab. 4.15) :

- la forte inhibition observée avec le *N*-bromosuccinimide, réversible par l'ajout de tryptophane, ainsi que l'inhibition partielle avec le 4-diméthylaminobenzaldéhyde, indique la présence d'un groupement indol au niveau du site actif et donc d'un résidu tryptophane.
- l'inhibition par l'iode et sa réversion partielle en présence de tyrosine révèle l'intervention d'un groupement phénol et, selon toute probabilité, de la tyrosine.
- la baisse d'activité mesurée après ajout d'acide acétique suggère l'intervention d'un acide aminé possédant un groupement -OH (sérine, thréonine).

Signalons que l'inhibition de l'activité amylasique observée après ajout d'EDTA n'est pas suffisamment significative pour conclure qu'un cofacteur métallique interviendrait au niveau du site actif. Cependant, comme nous l'avons précédemment souligné, les α -amylases sont toutes décrites dans la littérature, comme des métalloenzymes contenant en général du calcium (Ca^{2+}) dans le site actif. Néanmoins, le calcium est si fortement lié à l'enzyme que l'addition d'EDTA ne permet pas en général de chélater cet ion (FISCHER et STEIN, 1960 ; FOGARTY, 1983). Nous sommes ainsi amenés à supposer que l'enzyme contient un cofacteur métallique que les conditions opératoires utilisées n'ont pas permis de mettre en évidence.

Tableau 4.15 : Groupements intervenant dans le site actif de l'enzyme

Groupements	Présence
Cofacteur métallique	+
-NH ₂	-
$\begin{array}{c} \text{HN}=\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH} \end{array}$	-
OH-	+
HOOC-Terminal	-
HS-	-
S-S	n.d.
H ₂ N-Terminal	-
Phénol: 	+
Indol: 	+
Imidazol: 	-

4.3.4 - Conclusion

Le protocole de purification de l'amylase extracellulaire de *L. plantarum* A6 décrit dans cette étude, permet en deux étapes seulement, d'obtenir une fraction protéique contenant l'essentiel de l'activité amylasique enrichie par un facteur proche de 20. L'homogénéité de cette fraction, testée par électrophorèse en conditions natives, révèle la présence d'une protéine majeure et de trois autres protéines quantitativement peu importantes. Toutefois, l'ensemble des protéines détectées possèdent une activité amylasique. A ce niveau, nous pouvons donc considérer que le protocole suivi est suffisant pour permettre la purification de l'activité amylasique extracellulaire de *L. plantarum* A6.

L'analyse en SDS-PAGE de la fraction purifiée se traduit par une répartition entre une bande bien définie de 50 kDa et une bande diffuse de poids moléculaire proche de 150 kDa.

Pour expliquer l'existence de ces différentes formes d'amylases, plusieurs hypothèses ont été émises. L'une d'entre elles, la plus satisfaisante à notre avis, serait de considérer que l'extrait purifié est composé d'une population d'agrégats constitués d'une amylase de 50 kDa. Cette interprétation s'appuie sur le fait que la majorité des amylases bactériennes décrites ont un poids moléculaire de cet ordre de grandeur (FOGARTY, 1983). Par ailleurs, ce type d'agrégation d'une enzyme purifiée a déjà été observé pour l'amylase de *Bacillus subtilis* (ROBYT et ACKERMAN, 1973). Dans ce cas, le facteur induisant cette agrégation s'avérerait être le zinc. Dans notre cas, il reste à définir.

En l'état actuel, d'autres études expérimentales seraient nécessaires pour appuyer cette hypothèse. La quantité d'enzyme isolée ne nous a pas permis d'aller plus loin dans cette démarche. A l'évidence, une caractérisation immunologique permettrait de déterminer la nature et le lien de parenté entre les différentes formes d'amylases observées au cours de ce travail et ainsi de confirmer l'hypothèse formulée.

Par rapport aux caractéristiques des autres amylases bactériennes décrites dans la littérature, les propriétés de l'enzyme synthétisée par *L. plantarum* A6 sont très proches de celles de *B. subtilis* (FISCHER et STEIN, 1960 ; WELKER et CAMPBELL, 1967 ; ROBYT et ACKERMAN 1973 ; FOGARTY 1983) : enzyme extracellulaire, pH optimum identique, température optimale identique, intervention de résidus de tryptophane et de tyrosine lors de la catalyse et présence de formes multiples (agrégats).

La capacité exceptionnelle de la souche *L. plantarum* A6 à dégrader l'amidon, nous conduit à nous interroger sur l'acquisition de cette propriété. Pourrait-elle résulter d'un transfert de matériel génétique entre *B. subtilis* et *L. plantarum*, deux microorganismes de la microflore naturelle du manioc fermenté (NWANKO *et al.*, 1989), dont nous avons observé que les activités amylasiques présentaient de fortes similitudes ? Des études plus approfondies nous permettraient peut-être de répondre à cette question.

Résultats et discussion

4.4 - Dégradation de la linamarine par les bactéries lactiques

4.4.1 - Introduction

Comme nous l'avons souligné au cours de l'étude bibliographique, les racines de manioc contiennent en forte quantité deux glucosides cyanogéniques : la linamarine et la lotaustraline, qui leur confèrent une toxicité élevée. Bien que la majorité de ces composés toxiques soit éliminée au cours des différentes étapes de transformations, pour certains aliments, une quantité résiduelle peut être retrouvée selon le procédé de fabrication utilisé (NAMBISAN et SUNDARESAN, 1985). Une consommation journalière de ces derniers aliments peut donc entraîner une toxicité chronique se manifestant par des problèmes neurologiques et métaboliques (COCK, 1982).

Durant la préparation du gari, deux étapes semblent essentielles pour assurer une bonne détoxification (NAMBISAN et SUNDARESAN, 1985 ; VASCONCELOS *et al.*, 1990) : a) l'étape de râpage qui permet par l'endommagement de la structure cellulaire végétale, la libération d'une linamarase capable d'hydrolyser la linamarine en glucose et en acétone cyanohydrine (CONN, 1969), b) l'étape de cuisson qui permet une volatilisation des cyanures libres.

L'étape de fermentation caractérisée par un développement de la microflore lactique interviendrait par contre au niveau de l'obtention des caractéristiques organoleptiques du produit (NGABA et LEE, 1979 ; DOUGAN *et al.*, 1983).

Selon plusieurs auteurs (IKEDIOBI et ONYIKE, 1982a ; MAOPOOG *et al.*, 1989), la quantité de linamarase endogène ne suffirait pas à dégrader complètement la linamarine. Néanmoins, il a été démontré (IKEDIOBI et ONYIKE, 1982a et b), qu'il était possible de réduire la toxicité du gari par l'ajout, durant l'étape de fermentation, de linamarase purifiée à partir d'écorce. L'utilisation d'un tel procédé apparaît cependant, difficilement applicable. Aussi, certains auteurs (PADMAJA et BALAGOPAL, 1985 ; OKAFOR et EJOFOR, 1990) ont suggéré d'inoculer massivement les racines, pendant l'étape de fermentation, avec une souche microbienne sélectionnée pour son activité linamarase afin de réduire la toxicité liée à la présence de linamarine.

Dans ce chapitre, notre objectif a été de déterminer d'une part, si les bactéries lactiques qui constituent la flore prédominante intervenant dans le processus de fermentation (NGABA et LEE, 1979), avaient une activité linamarase et d'autre part, de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de dégradation des glucosides cyanogéniques par ces bactéries.

4.4.2 - Résistance des bactéries lactiques au cyanure

Lors de la fermentation du manioc, la dégradation des composés cyanogéniques conduit à l'accumulation d'une quantité de cyanures libres dans le milieu de fermentation pouvant atteindre 200 ppm (VASCONCELOS *et al.*, 1990).

L'effet très toxique du cyanure sur le métabolisme cellulaire est connu depuis longtemps. Cette molécule est un inhibiteur très puissant de la cytochrome oxydase mais aussi d'autres variétés d'enzymes comme les hémoprotéines, les oxydases ou les oxygénases contenant d'autres métaux. Des études ont mis en évidence que certains microorganismes étaient capables de se développer en présence de cyanure. Notamment, certaines espèces (*Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Brevibacterium* sp, *Enterobacter*...) produisent des enzymes (rhodanèse, nitrile hydratase, β -cyanoalanine synthase) capables de détoxifier ce composé (CASTRIC et STROBEL, 1969 ; SAKAI *et al.*, 1981 ; HARRIS et KNOWLES, 1983 ; ROLLINSON *et al.*, 1987 ; LEGRAS *et al.*, 1989). D'autres (*Citrobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Dekkera intermedia*, *Brettanomyces custersii*, etc) ont su développer une voie respiratoire résistante aux cyanures (KNOWLES, 1976 ; BLONDIN *et al.*, 1984 ; KNOWLES et BUNCH, 1986).

Cette étude préliminaire a été réalisée afin de déterminer la sensibilité des bactéries lactiques (microorganismes aéro-tolérants, dépourvus de chaîne respiratoire) aux cyanures. Quatre souches ont été étudiées : *L. plantarum* Lacto Labo, *L. plantarum* A6, *S. lactis* et *Leuconostoc mesenteroides*. Ces souches ont été cultivées à 30°C, sur milieu MRS glucose contenant différentes concentrations de cyanure (0 ; 100 ; 300 ; 500 et 1000 ppm de CN⁻ ; le pH du milieu a été réajusté à 6,5 après ajout du cyanure stérilisé par filtration). Après 48 h d'incubation, la biomasse des souches étudiées a été mesurée pour chacune des concentrations en cyanure testées. La figure 4.24 résume les résultats obtenus.

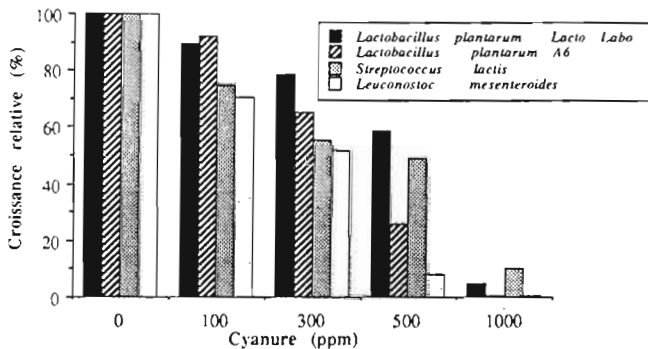


Figure 4.24 : Effet du cyanure sur la croissance de différentes souches de bactéries lactiques.

Nous observons que la croissance des souches diminue lorsque la concentration en cyanure augmente et est complètement inhibée pour des concentrations proches de 1000 ppm. Notons cependant qu'à 300 ppm, le taux d'inhibition de la croissance est d'environ de 50 %. Il apparaît ainsi que l'effet inhibiteur du cyanure sur les bactéries lactiques reste relativement faible. En revanche, la croissance d'autres bactéries, comme *Escherichia coli*, est totalement inhibée pour une concentration de cyanure de 2 à 3 ppm seulement (KNOWLES, 1976). Cette capacité des bactéries lactiques à résister à des concentrations aussi élevées en cyanure, montre que ce sont des germes très compétitifs et bien adaptés aux milieux à base de manioc. Cette propriété est probablement responsable de leur prédominance dans la microflore naturelle au cours des fermentations du manioc, et laisse présager qu'elles seraient de bonnes candidates pour dégrader la linamarine. Une activité linamarase a d'ailleurs déjà été mise en évidence chez *L. mesenteroides* (OKAFOR et EJIOFOR, 1985).

4.4.3 - Mise en évidence d'une activité linamarase chez différentes bactéries lactiques

La linamarase étant une β -glucosidase, il nous a paru intéressant de mesurer simultanément l'activité aryl- β -glucosidase en utilisant le pNPG comme substrat et en suivant l'apparition de pNP, et l'activité linamarase en utilisant la linamarine comme substrat et en suivant la production de cyanures libres. Ces activités ont été mesurées pour dix bactéries lactiques dont sept de collection choisies arbitrairement, après croissance en Erlen (20 heures à 30°C) sur milieu MRS cellobiose. Le cellobiose a été choisi comme substrat pour induire la synthèse de β -glucosidase. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.16.

Parmi les dix souches testées, six présentent une activité linamarase : *L. plantarum* Lacto Labo, *L. plantarum* A6, *L. plantarum* A43, *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*. Pour chacune des souches testées, cette activité a été mesurée sur le culot cellulaire, aucune activité n'ayant été mise en évidence sur le surnageant de la culture. Comme nous pouvons le constater, la capacité à dégrader la linamarine est une propriété fréquemment rencontrée chez les bactéries lactiques. Les résultats font apparaître que toutes les souches caractérisées par une activité aryl- β -glucosidase, possèdent également une activité linamarase, à l'exception de *L. brevis*. Ceci est en accord avec les résultats d'OKAFOR et d'EJIOFOR (1986). Cependant à partir de ces résultats, nous ne pouvons affirmer que l'hydrolyse du pNPG et de la linamarine soit réalisée par la même enzyme.

Parmi ces six souches, les souches de *L. plantarum* semblent, une fois de plus, les plus intéressantes. En effet, elles présentent les plus fortes activités linamarases mesurées (supérieure à 30 U/g de biomasse) et les croissances les plus élevées (cf. § 4.1). La souche *L. plantarum* A6 a été sélectionnée pour la suite de cette étude, en raison de son caractère fortement amylolytique (cf. § 4.2) et sa forte activité linamarase.

Résultats et discussion

Tableau 4.16 : Comparaison des activités linamarase et aryl- β -glucosidase de différentes bactéries lactiques cultivées sur milieu MRS cellobiose (10 g/l). * = non détecté.

Microorganisme	Biomasse g/l	Linamarase U/ g de biomasse	Aryl- β -glucosidase U/ g de biomasse
<i>L. plantarum</i> A6	2,5	35,5	12,1
<i>L. plantarum</i> A43	2,4	31,4	12,0
<i>L. plantarum</i> (Lacto labo)	3,0	30,5	9,9
<i>L. brevis</i>	0,3	*	0,9
<i>L. amylophilus</i>	0,3	*	*
<i>S. lactis</i>	0,5	19,0	19,1
<i>S. equinus</i>	0,4	*	*
<i>L. mesenteroides</i>	0,5	4,4	5,7
<i>L. cremoris</i>	0,3	*	*
<i>P. pentosaceus</i>	1,1	26,6	41,2

4.4.4 - Influence de la source de carbone sur la production de linamarase

Afin de déterminer la source de carbone permettant une production maximale de linamarase, l'activité enzymatique a été mesurée après croissance en Erlenmeyer (20 heures à 30°C) sur des milieux MRS contenant différents substrats carbonés.

Comme précédemment, les activités linamarase et β -glucosidase ont été mesurées au niveau des culots cellulaires (cf. tab. 4.17), aucune d'entre elles n'ayant pu être mise en évidence dans le surnageant des cultures.

Tableau 4.17 : Comparaison des activités linamarase et β -glucosidase de *L. plantarum* A6, cultivé sur différents substrats carbonés.

Source de carbone	Linamarase U/ g de biomasse	aryl- β -glucosidase U/ g de biomasse	Rapport linamarase/ aryl- β -glucosidase
Cellobiose	35,5	12,1	2,9
Mélibiose	12,1	15,1	0,8
Lactose	6,2	8,6	0,7
Amidon	5,6	7,4	0,8
Saccharose	3,4	7	0,5
Maltose	1,5	2,7	0,6
Glucose	1,5	3,4	0,4

Quelle que soit la source de carbone utilisée, nous avons pu mesurer une activité linamarase et aryl- β -glucosidase avec cependant de fortes variations du niveau de production. Le maltose, le glucose, le lactose, le saccharose et l'amidon ne permettent d'obtenir qu'une faible production de linamarase. Le mélibiose permet une production d'enzyme plus importante bien que trois fois inférieure à celle obtenue avec du cellobiose. Il apparaît donc que la linamarase est une enzyme constitutive chez *L. plantarum* A6 et que le taux de production peut être augmenté suivant le substrat carboné. Ces résultats diffèrent de ceux observés par OKAFOR et EJIOFOR (1985) pour la souche *L. mesenteroides* pour laquelle une activité linamarase était induite uniquement lorsque la linamarine était utilisée comme source de carbone.

Si nous calculons le rapport des activités linamarase et β -glucosidase, nous observons qu'il est inférieur à 1 pour tous les substrats étudiés, à l'exception du cellobiose pour lequel ce rapport est proche de 3. Il est donc possible, comme cela a été observé chez certains microorganismes comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Fibrobacter succinogenes*, *Clostridium thermocellum* (KAPLAN et TACHEITER, 1966 ; GRABNITZ et STAUDENBAUER, 1988 ; BUCHAMAN et MITCHELL, 1992), que *L. plantarum* A6 synthétise deux β -glucosidases présentant des affinités différentes, dont une (la linamarase) serait fortement induite par le cellobiose.

4.4.5 - Analyse par HPLC des produits de dégradation de la linamarine

Un culot obtenu à partir d'une culture de 20 heures sur MRS cellobiose de *L. plantarum* A6, est remis en suspension après lavage, dans un tampon acétate contenant de la linamarine. Le mélange réactionnel est alors analysé par HPLC, après différents temps d'incubation (cf. fig 4.25).

Après 30 min d'incubation, la linamarine est complètement dégradée en acide lactique et en acétone cyanohydrine. Le glucose résultant de la réaction d'hydrolyse de la linamarine est ainsi immédiatement transformé en acide lactique par les bactéries, qui semblent alors fonctionner en condition de non prolifération. Ce résultat permet de mettre en évidence sans ambiguïté la capacité de cette souche à dégrader la linamarine, et constitue une preuve originale par rapport aux précédents travaux réalisés par IKEDIJOBI *et al.*(1985 et 1987) et OKAFOR et EJIOFOR (1990), sur la dégradation de la linamarine par certains microorganismes comme *Leuconostoc mesenteroides*, *Aspergillus sydowi*, *Fusarium equiseti*...

L'analyse quantitative des différents composés formés nous a permis d'établir le bilan de la réaction de dégradation de la linamarine:

1 mole de linamarine \longrightarrow 1,64 moles d'acide lactique + 1 mole d'acétone cyanohydrine

Bien que la dégradation de la linamarine soit totale, on ne retrouve que 1,64 moles d'acide lactique au lieu des 2 moles attendues. Les cellules étant en condition de non-prolifération, et aucun autre métabolite n'ayant été détecté, on peut supposer qu'une partie du glucose libéré est utilisée pour assurer l'énergie de maintenance des cellules.

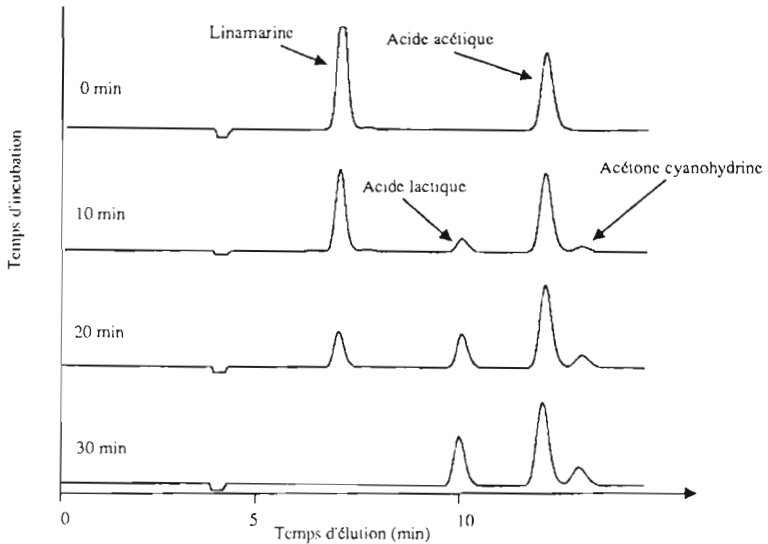


Figure 4. 25 : Analyse par HPLC des produits de dégradation de la linamarine par des cellules de *L. plantarum* A6 après différents temps d'incubation (30°C ; pH 5.5).

4.4.6 - Dégradation par *L. plantarum* A6 de la linamarine extraite du manioc

Cette étude a été réalisée afin de confirmer la capacité de la souche *L. plantarum* A6 à dégrader la linamarine contenue dans un extrait de manioc. Pour mettre en évidence l'activité linamarase propre à la bactérie étudiée, une inactivation préalable de la linamarase endogène du manioc a été effectuée. Le protocole opératoire est le suivant :

200 g de manioc frais sont râpés dans 64 ml d'acide orthophosphorique 0,5 M puis broyés deux fois pendant 1 min au mixer afin d'extraire la linamarine. Le jus, récupéré par pressage et ajusté à pH 9 avec du KOH 10 N, est porté à ébullition pendant 5 min afin d'inactiver la linamarase endogène. Après refroidissement, le pH est réajusté à 6. A partir de cet extrait, différentes fractions

de 3 ml sont préparées, auxquelles on ajoute : 1 mg de linamarine (essai 1) ; 0,5 UI de linamarase (essai 2) ; 1 culot de 5 ml d'une culture sur milieu MRS cellobiose de *L. plantarum* A6 (essai 3) ou 1 mg de linamarine + 1 culot de 5 ml de *L. plantarum* A6 (essai 4). On suit l'apparition de cyanures sur les différentes fractions ainsi préparées. Les résultats de cette étude sont présentés sur la figure 4.26.

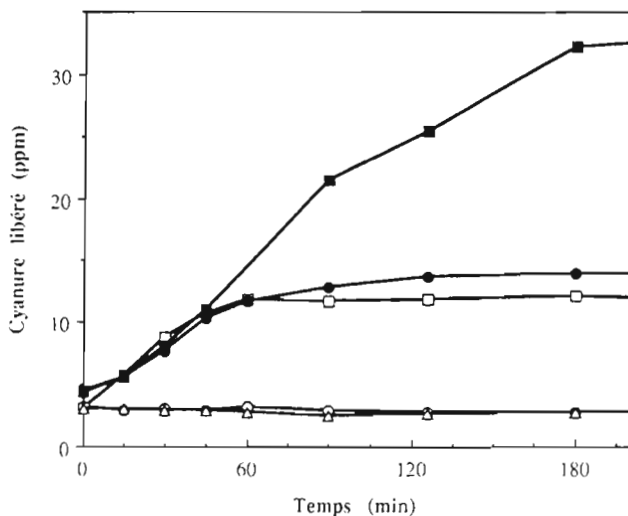


Figure 4.26 : Libération de cyanure à partir d'un extrait de manioc après inhibition de la linamarase endogène. Δ, extrait (témoin) ; ○, extrait + Linamarine (essai 1) ; □, extrait + linamarase (essai 2) ; ●, extrait + culot de *L. plantarum* A6 (essai 3) ; ■, extrait + culot de *L. plantarum* A6 + linamarine (essai 4).

Nous pouvons observer que la linamarase endogène dans l'extrait de manioc obtenu (témoin), a été effectivement inactivée car on ne décèle aucune apparition de cyanures libres, même après addition de linamarine (essai 1). Cependant, l'extrait contient de la linamarine car après ajout de linamarase, nous notons une apparition rapide de cyanures qui atteint un palier après 60 min (essai 2). L'addition de cellules de *L. plantarum* A6 à l'extrait de manioc (essai 3) entraîne une libération de cyanures comparable à celle précédemment observée, ce qui met en évidence la capacité de cette bactérie à dégrader rapidement la linamarine contenue dans le manioc. Comme la quantité de linamarine extraite par le protocole opératoire était relativement faible, un essai supplémentaire a été réalisé en rajoutant dans l'extrait, de la linamarine du commerce. Nous observons alors que la bactérie est capable de dégrader une quantité supérieure de linamarine (essai 4).

4.4.7 - Mise en évidence de deux systèmes enzymatiques d'hydrolyse des β -glucosides

La linamarase produite par *L. plantarum* A6 est retrouvée uniquement dans le culot de centrifugation de la culture. L'enzyme est donc soit pariétale, soit intracellulaire. Afin de mieux caractériser cette activité enzymatique, nous avons tenté de la solubiliser. Différentes techniques d'éclatement des cellules ont été utilisées (presse de French, ultrasons, lyse enzymatique). Seule l'utilisation de lysosyme et de mutanolysine nous a permis de lyser efficacement les cellules de *L. plantarum* A6.

Sur chacune des fractions cellulaires obtenues (cf. § 3.10), nous avons mesuré les activités linamarase et aryl- β -glucosidase. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.18.

Tableau 4.18 : Activités linamarase et aryl- β -glucosidase des différentes fractions cellulaires de *L. plantarum* A6. * = non détecté

Fraction cellulaire	Activité relative aryl- β -glucosidase	Activité relative linamarase
Milieu extracellulaire	*	*
A : Cellules entières	100%	100%
B : Sumageant protoplastes	*	*
C : Protoplastes entiers	110%	105%
D : Protoplastes lysés	*	*
E : Protoplastes lysés + ATP+ Mg ²⁺	110%	*
F : Sumageant protoplastes lysés + ATP+ Mg ²⁺	105%	*
G : Culot protoplastes lysés + ATP+ Mg ²⁺	5%	*

Nous observons qu'il est possible d'obtenir des protoplastes dans lesquels les activités linamarase et β -glucosidase initiales sont conservées. Cependant, ces activités sont totalement perdues après éclatement des protoplastes par choc osmotique (fraction D : cytoplasme + membranes et résidus de paroi).

Pour tenter de préserver ces activités enzymatiques, nous avons fait éclater les protoplastes en présence de différents facteurs : DTT, EDTA, cations (Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Na⁺, K⁺), anions (Cl⁻, SO₄²⁻, NO₂⁻, PO₄³⁻), glycérol, Triton X100, UTP, CTP, GTP, ATP, AMPc, NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH et différents tampons à divers pH.

Aucune activité linamarase n'a pu être retrouvée après la lyse des protoplastes quel que soit le facteur et la fraction testés. Par contre, une activité β -glucosidase a pu être totalement restaurée si de l'ATP et du Mg²⁺ sont rajoutés après la lyse des protoplastes (fraction E). Après centrifugation,

cette activité est principalement retrouvée dans le surnageant du lysat (fraction F). L'activité β -glucosidase semble donc être intracellulaire et ATP-Mg²⁺ dépendante.

Ces résultats, en accord avec ceux présentés au chapitre 4.4.4, tendent à montrer que *L. plantarum* A6 synthétise deux systèmes enzymatiques différents : le premier responsable du clivage du pNPG (aryl- β -glucosidase), le second responsable du clivage de la linamarine (linamarase). Néanmoins, nous ne pouvons écarter complètement l'hypothèse qu'un seul système enzymatique soit responsable du clivage de ces deux substrats. En effet, il est possible qu'*in vitro*, les cyanures libérés lors de l'hydrolyse de la linamarine entraînent une inhibition irréversible de ce système enzymatique (les cyanures étant connus pour inhiber fortement le fonctionnement de nombreuses enzymes et en particulier les métalloenzymes). Ceci permettrait d'expliquer qu'un clivage du pNPG ait été observé *in vitro*, mais qu'aucun clivage de la linamarine n'ait pu être mis en évidence.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons mesuré l'activité β -glucosidase de la fraction solubilisée (fraction F) sur le pNPG en présence de cyanure et de linamarine en excès. Par ailleurs, il nous a paru intéressant de tester les interactions possibles du cellobiose sur la dégradation du pNPG par la β -glucosidase. De l'ATP et du Mg²⁺, à une concentration de 5 mM, ont été rajoutés dans tous les essais.

Tableau 4.19 : Inhibition de l'activité aryl- β -glucosidase.

Essais sur fraction F	Activité relative aryl- β -glucosidase
pNPG 1mM	100%
pNPG 1mM + CN ⁻ 100ppm	103%
pNPG 1mM + Linamarine 5mM	67%
pNPG 1mM + Cellobiose 5mM	2%

Les résultats obtenus (cf. tab. 4.19) montrent que :

- Les cyanures n'ont aucun effet inhibiteur sur l'activité β -glucosidase.
- La linamarine apportée en excès par rapport au pNPG, inhibe de 30% l'activité β -glucosidase sans pour autant être hydrolysée (cf. tab. 4.17). La linamarine constitue donc un inhibiteur compétitif et non un substrat de cette enzyme.
- Le cellobiose en excès réduit presque en totalité la vitesse apparente de l'hydrolyse du pNPG. Par ailleurs, des analyses réalisées en parallèle par HPLC (résultats non montrés) révèlent que le cellobiose est hydrolysé. Le cellobiose constitue donc bien un substrat de la β -glucosidase.

Résultats et discussion

D'autres expériences seraient à réaliser afin de déterminer si la β -glucosidase a une affinité plus importante pour le cellobiose que pour le pNPG.

Ces résultats nous permettent toutefois de rejeter l'hypothèse selon laquelle l'enzyme serait inhibée *in vitro* par les cyanures, et confirme l'existence de deux systèmes enzymatiques. La restauration de l'activité linamarase après éclatement des protoplastes, pourrait nécessiter des conditions physico-chimiques ou la présence d'un effecteur spécifique, que nous n'avons pu déterminer dans cette étude.

Effet de la température de conservation sur les activités β -glucosidase et linamarase

Au cours de notre étude, nous avons constaté une différence de comportement des deux activités enzymatiques (mesurées sur les cellules entières) suivant la température de conservation. Pour étudier plus en détail ce phénomène, nous avons récupéré un culot de cellules fraîches après culture sur MRS cellobiose. Le culot a alors été séparé en quatre fractions qui ont été placées à différentes températures.

Après 24 heures de conservation, les activités linamarase et β -glucosidase ont été mesurées. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.20.

Tableau 4.20 : Effet de la température de conservation sur les activités aryl- β -glucosidase et linamarase.

Température de conservation	Activité relative aryl- β -glucosidase	Activité relative linamarase
+ 4°C	100%	100%
+ 20°C	80%	80%
- 30°C	86%	32%
-30 °C avec glycérol 20%	87%	86%

On constate que l'activité linamarase diminue fortement après 24 h de conservation à - 30°C, alors que l'activité β -glucosidase n'est pas modifiée significativement. Cette différence de comportement confirmerait que les activités linamarase et β -glucosidase constituent deux systèmes enzymatiques différents. Notons par ailleurs que l'addition de glycérol, agent cryoprotecteur, permet de conserver pratiquement l'intégralité de l'activité linamarase initiale. Ce dernier résultat nous amène à supposer que la linamarase est probablement membranaire. En effet, la congélation des cellules sans cryoprotecteur entraîne souvent des dommages au niveau de la membrane, pouvant ainsi inactiver partiellement les enzymes fortement liées à celle-ci.

4.4.8 - Conclusion

Nous avons pu mettre en évidence une bonne résistance des bactéries lactiques aux cyanures, et la biosynthèse d'activités aryl- β -glucosidase et linamarase chez certaines souches. La souche *L. plantarum* A6 présente la plus forte activité linamarase mesurée et son niveau de production peut être fortement stimulé par le cellobiose.

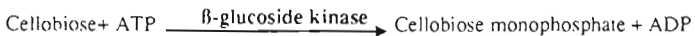
Notons que MCKAY (1992) propose l'utilisation de *L. plantarum* dans la détoxification de la fève. Cet auteur a montré que ce microorganisme pouvait hydrolyser, grâce à une activité β -glucosidase, les composés toxiques (la vicine et la convicine : pyrimidine glucoside) présents dans les fèves. Ces composés sont responsables d'anémisme et de favisme chez l'homme.

La caractérisation de l'activité linamarase de ce microorganisme n'a pas pu être réalisée, car il n'a pas été possible de la solubiliser. Cependant, les observations que nous avons faites au cours de ces divers essais, tendent à montrer que *L. plantarum* A6 possède deux systèmes enzymatiques différents permettant l'hydrolyse des β -glucosides :

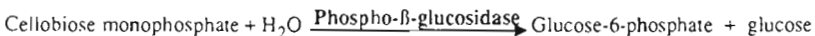
- un premier, spécifique de la linamarine, qui serait localisé dans la membrane cellulaire,
- un second, intracellulaire, ATP-Mg²⁺ dépendant, qui permet le clivage du pNPG et du cellobiose mais non de la linamarine, et que nous avons réussi à solubiliser.

La synthèse de plusieurs activités β -glucosidases, présentant des affinités différentes chez un même microorganisme, a été décrite pour plusieurs souches (cf. § 4.4.4). Cependant, la nécessité d'un apport en ATP et Mg²⁺ pour la dégradation d'un β -glucoside, n'a été démontrée, à notre connaissance, qu'une seule fois, dans le cas du clivage du cellobiose par *Aerobacter aerogenes* (PALMER et ANDERSON, 1971). Ces auteurs ont mis en évidence chez ce microorganisme, l'intervention de 2 enzymes :

- une première enzyme (β -glucoside kinase), ATP-Mg²⁺ dépendante, permettant la phosphorylation du cellobiose (PALMER et ANDERSON, 1972 a) :



- une deuxième enzyme (phospho- β -glucosidase) permettant l'hydrolyse du cellobiose monophosphate (PALMER et ANDERSON, 1972 b) :



Cette voie de dégradation du cellobiose est originale. En effet, chez les autres microorganismes, le cellobiose est clivé directement soit par hydrolyse, soit par phosphoryse, sans une étape préalable de phosphorylation (ALEXANDER, 1968 ; WOODWARD et WISEMAN, 1982 ; SCHIMZ *et al.*, 1983).

Pour conclure, nous soulignerons que le rôle de la microflore lactique dans le processus de détoxification est soumis à discussion. OKAFOR et EJIOFOR (1986) suggèrent l'intervention des microorganismes incluant *L. mesenteroides*, dans la dégradation de la linamarine de la pulpe de manioc, alors que VASCONCELOS *et al.* (1990) considèrent que la détoxification du manioc est essentiellement le résultat de la linamarase endogène et que la flore lactique n'est pas directement impliquée dans cette hydrolyse.

Les résultats obtenus ont mis en évidence sans aucune ambiguïté, la capacité de certaines souches lactiques à dégrader la linamarine du manioc. Néanmoins, ils ne nous permettent pas de conclure à la participation réelle de cette microflore dans le processus de détoxification du manioc. Les prochains objectifs de cette étude seront donc de déterminer si l'inoculation en masse des racines de manioc avec la souche *L. plantarum* A6 présentant une forte activité linamarase, pourrait constituer une solution pour diminuer la toxicité des aliments.

4.5 - Production d'un starter de *L. plantarum* A6 et effet sur la fermentation du manioc

4.5.1 - Introduction

Comme nous l'avons observé au cours des chapitres précédents, la souche *L. plantarum* A6 présente des potentialités intéressantes : souche acido-tolérante, produisant de l'acide lactique en forte quantité, ayant un taux de croissance élevé avec un rendement en biomasse/substrat important, capable de dégrader l'amidon ainsi que la linamarine. Bien qu'elle ne produise pas principalement l'isomère L(+) lactate, la souche présente la majorité des critères que nous avons considérés comme nécessaires pour constituer un starter efficace pour la fermentation du manioc en vue de la production de gari (cf. § 4.1).

Cependant, nous avons noté une influence notable du substrat carboné sur la biosynthèse de l'amylase et de la linamarase. L'amidon apparaît comme le substrat carboné permettant une production maximale d'amylase tandis que le cellobiose permet une production maximale de linamarase. Par ailleurs, les conditions de conservation du microorganisme ont une influence sur le maintien de cette dernière activité enzymatique.

Ici, notre objectif a été d'une part, d'étudier la physiologie de *L. plantarum* A6 en vue de produire un starter dans lequel la souche serait dans un état physiologiquement actif, produisant simultanément une activité amylase et linamarase, et d'autre part, d'étudier l'effet d'un tel inoculum sur la fermentation naturelle du manioc.

4.5.2 - Production d'un starter de *L. plantarum* A6

Les figures 4.27, 4.28 et 4.29 représentent les cinétiques de croissance, de consommation des sucres et de production de linamarase et d'amylase de *L. plantarum* A6 cultivé en fermenteur sur milieu MRS contenant différentes sources de carbone (cellobiose, cellobiose + glucose, cellobiose + amidon). Les bilans de fermentation sont présentés dans le tableau 4.21.

Tableau 4.21 : Paramètres de fermentation de *L. plantarum* A6 cultivé sur différents milieux.

Milieu	μ h ⁻¹	Biomasse g/l	Y _{X/S} g/g	Activité linamarase U/g	Activité amylase U/ml
MRS Cellobiose (2%)	0,41	5	0,22	76,4	36
MRS Cellobiose (1%)-Glucose (1%)	0,46	5	0,23	58,6	41,9
MRS Cellobiose (1%)-Amidon (1%)	0,44	4,5	0,23	49,1	30

Pour les trois milieux testés, les rendements en biomasse et les taux de croissance obtenus sont élevés, et sensiblement identiques. Cependant, les quantités de linamarase et d'amylase produites diffèrent suivant le milieu utilisé.

Sur MRS-cellobiose

Les biosynthèses de linamarase et d'amylase apparaissent dès le début de la fermentation et semblent corrélées à la production de biomasse (cf. fig. 4.27). Les quantités maximales d'enzymes produites sont obtenues à la fin de la phase de croissance et atteignent 76,4 U linamarase/g de cellules et 36 U amylase/ml de surnageant. Les travaux précédemment réalisés en fioles (cf § 4.4.4) avaient montré que, sur ce même milieu, la quantité de linamarase produite était de 29 U/g. En fermenteur, dans des conditions contrôlées, ce niveau a donc fortement augmenté d'un facteur de 2.6.

Il est intéressant de noter que le taux d'amylase est légèrement supérieur à celui obtenu sur le milieu MRS-cellobiose-amidon (cf. fig. 4.29). Ce résultat est en désaccord avec ceux précédemment obtenus au cours de l'étude de l'influence de la source de carbone sur le niveau de production d'amylase par *L. plantarum* A6 cultivé en fiole. En effet, un taux maximum de production était observé quand l'amidon était utilisé comme substrat (cf. § 4.2.3.2). Ceci pourrait résulter des conditions de culture différentes (pH régulé, agitation...), ou bien de la détermination de l'activité amyliase (en phase de croissance en fermenteur ; en phase stationnaire, voire en phase de lyse lors des cultures en Erlenmeyers).

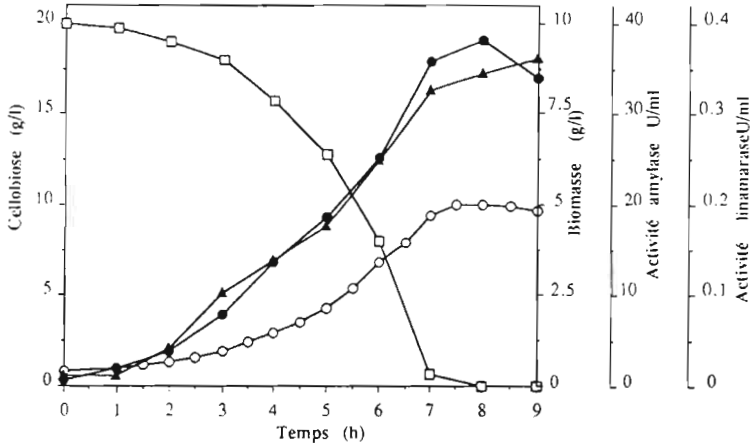


Figure 4.27 : Fermentation de *L. plantarum* A6 sur MRS-cellobiose à 30°C et pH 6.0 : □, cellulose; ○, biomasse; ▲, activité amylase; ●, activité linamarase

Sur MRS-cellobiose-glucose

Les cinétiques (cf. fig. 4.28) font apparaître que le glucose est rapidement consommé durant les quatre premières heures de la fermentation, tandis que la quantité de cellobiose reste constante. Durant cette phase, nous observons également que les quantités de linamarase et d'amylase produites sont extrêmement faibles. Lorsque la concentration en glucose devient inférieure à 3 g/l, nous observons une chute brusque du cellobiose, corrélée à une production rapide de linamarase. La synthèse d'amylase est légèrement retardée et survient uniquement lorsque la concentration de glucose est pratiquement nulle. Ainsi 80 à 90% de la quantité d'amylase produite sont synthétisés après la phase exponentielle de croissance. Il est intéressant de noter que la synthèse de cette dernière enzyme est alors extrêmement rapide et atteint un niveau de production supérieur à celui observé sur les deux autres milieux testés.

Cette étude met ainsi en évidence un effet répresseur du glucose sur la synthèse de ces deux enzymes, avec toutefois un effet plus marqué sur la synthèse de l'amylase. Notons que ABALAKA et GARBA (1989) avaient également rapporté une forte influence du niveau de glucose sur la production de linamarase chez certains champignons.

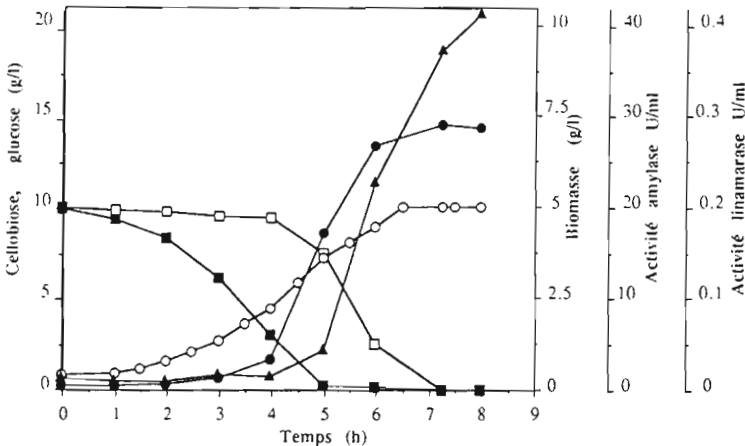


Figure 4.28 : Fermentation de *L. plantarum* A6 sur MRS-cellobiose-glucose à 30°C et pH 6.0 : ■, glucose; □, cellobiose; ○, biomasse; ▲, activité amylase; ●, activité linamarase

Sur MRS-cellobiose-amidon

Le profil de croissance de *L. plantarum* A6 (cf. fig 4.29) est différent de celui observé sur les deux autres milieux étudiés et la quantité de biomasse produite est légèrement inférieure (10%). Une phase linéaire de croissance est observée après 5 h de fermentation, elle semble être liée à une difficulté du microorganisme à utiliser certains produits de dégradation de l'amidon (dextrines), qui se traduit par un ralentissement de la consommation des sucres totaux après 6 h de culture.

En ce qui concerne la synthèse des enzymes, nous observons une production de linamarase et d'amylase dès le début de la fermentation. Cependant, alors que la production de linamarase semble être corrélée à la production de biomasse, comme dans le cas de la culture sur MRS-cellobiose, l'amylase est principalement produite pendant la phase linéaire de la croissance. Durant cette phase, la quantité d'amylase produite augmente de 200% alors que la biomasse n'augmente que de 30%.

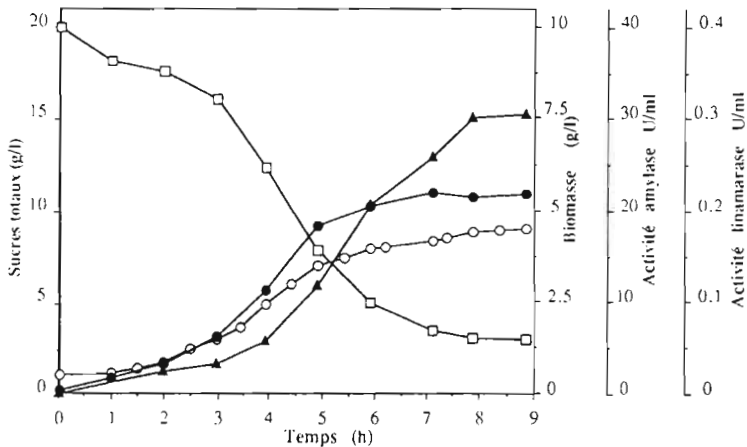


Figure 4.29 : Fermentation de *L. plantarum* A6 sur MRS-cellobiose-amidon à 30°C et pH 6.0 : □ . sucres totaux; ○ . biomasse; ▲ . activité amylase; ● . activité linamarase

Le contrôle de la source de carbone sur les taux et les cinétiques de production de linamarase et d'amylase nous permet d'optimiser la culture de *L. plantarum* A6. En fermenteur sur milieu MRS-cellobiose, nous obtenons ainsi la plus forte production de linamarase et une quantité élevée d'amylase.

Le fort rendement en biomasse ainsi que les quantités importantes de linamarase et d'amylase produites simultanément, confirment que *L. plantarum* A6 peut constituer un starter intéressant pour la fermentation naturelle du manioc.

Résultats et discussion

4.5.3 - Inoculation de la pulpe de manioc par *L. plantarum* A6

Trois essais ont été réalisés : a) fermentation naturelle du manioc, b) fermentation du manioc a près inoculation avec *L. plantarum* A6. c) fermentation du manioc après inoculation avec *L. plantarum* Lacto Labo (souche témoin).

Les souches utilisées comme starter ont été préalablement cultivées en fermenteur sur milieu MRS-cellobiose, puis récoltées après la phase exponentielle de croissance, lavées et conservées à 4°C dans de l'eau physiologique jusqu'au moment de l'inoculation (24 h).

Au cours de ces fermentations (cf. § 3.12), nous avons suivi l'évolution du pH, de la flore lactique, des acides organiques, des différents composés cyanurés (linamarine, cyanohydrines et HCN), et de l'activité linamarase endogène du manioc.

Evolution du pH, des acides organiques et de la flore lactique

Nous constatons dans les trois essais réalisés, une diminution rapide du pH dès le premier jour de fermentation (cf. fig. 4.30). Le pH chute de 6,2 à 4,3 dans le cas de la fermentation naturelle et de 6,2 à 3,8 dans le cas d'une inoculation. Cette variation du pH est corrélée avec la production d'acide lactique qui est le principal métabolite formé (cf. fig. 4.31). Cette observation confirme que la flore lactique est la microflore fermentaire prédominante. Elle atteint dans les trois cas, un maximum de 5.10^9 UFC/g de MS après 24 h (cf. fig. 4.30).

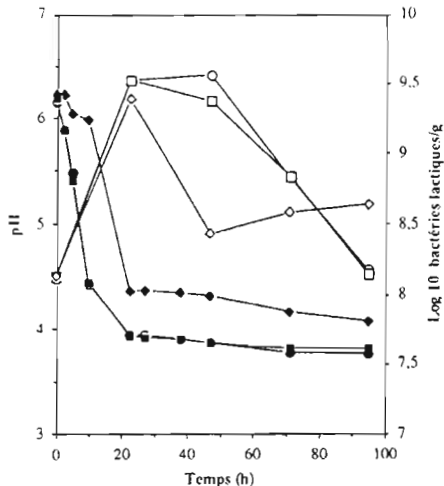


Figure 4.30 : Evolution du pH et du nombre de bactéries lactiques (LAB) durant la fermentation du manioc. Fermentation naturelle (◆, pH; ◇, LAB) ; Inoculation avec *L. plantarum* A6 (●, pH ; ○, LAB) ; Inoculation avec *L. plantarum* Lacto Labo (■, pH; □, LAB).

Résultats et discussion

Dans le cas de la fermentation naturelle, nous observons durant les 24 premières heures, une production simultanée d'acide lactique et d'acide acétique et, à l'état de traces, d'acide propionique, d'acide butyrique et d'éthanol. On note cependant, que la teneur en acétate est maximale dès la vingtième heure de fermentation (1 g/100 g MS) et reste constante ensuite, alors que la concentration en lactate augmente régulièrement à partir du deuxième jour, pour atteindre 3,3 g/100 g MS au quatrième jour de fermentation.

On peut ainsi supposer que dans un premier temps, la fermentation serait liée au développement d'une flore hétérolactique, supplantée dans un deuxième temps par une flore homolactique plus tolérante aux pH acides. Cette hypothèse est en accord avec les résultats d'OYEWOLE et ODUNFA (1990) qui observent, durant la préparation du fofou, un développement majoritaire de *L. mesenteroides* supplanté dans un deuxième temps par *L. plantarum*. Ils suggèrent que cette succession serait liée à une incapacité de *L. mesenteroides* à tolérer l'augmentation d'acidité. Pour MCDONALD *et al.* (1990), la capacité de *L. plantarum* à maintenir un gradient de pH (entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule) en présence de fortes quantités d'acétate et de lactate, expliquerait, dans la plupart des cas, que ce microorganisme intervienne en dernier lieu dans les fermentations des végétaux. Par opposition, l'incapacité de *L. mesenteroides* à maintenir un gradient de pH, expliquerait son élimination dès le premier stade de la fermentation.

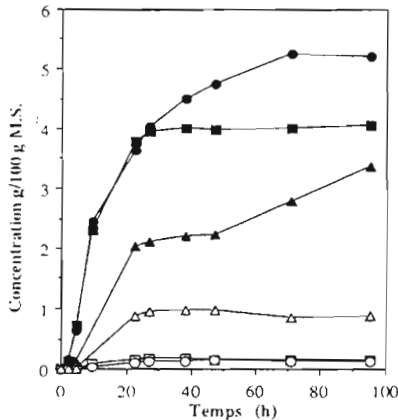


Figure 4.31 : Evolution des concentrations en lactate et acétate durant la fermentation du manioc. Fermentation naturelle (▲, lactate; △, acétate) ; Inoculation avec *L. plantarum* A6 (●, lactate ; ○, acétate) ; Inoculation avec *L. plantarum* Lactolabo (■, lactate ; □, acétate).

Il apparaît que la production de lactate est plus importante dans le cas des fermentations réalisées avec inoculation, avec cependant des différences au niveau des cinétiques de production de cet acide après 24 heures de fermentation selon la souche considérée. On observe en effet que

la teneur en lactate atteint son maximum (4 g/100 g MS) et reste stable après un jour de fermentation pour la souche témoin alors que dans le cas de l'utilisation d'une souche amylolytique (*L. plantarum* A6), la production de lactate se poursuit et augmente encore de plus de 25%.

La plus faible production d'acétate observée au cours des essais avec inoculation suggère que l'inoculation massive du manioc avec une souche de *L. plantarum* supplanterait le développement de la microflore naturelle hétérolactique. Ce résultat est en accord avec ceux de SAUCEDO *et al.* (1990), obtenus lors de l'étude de l'ensilage du manioc.

Evolution des composés cyanurés et de la linamarase endogène

Dans les trois traitements réalisés, les cyanures initialement présents sous forme de linamarine sont transformés, en moins de 5 heures, en acétone cyanohydrine et en HCN (cf. fig. 4.32). La quantité de cyanures libres n'évolue plus alors jusqu'à la fin de la fermentation. On note cependant que dans les essais inoculés, la proportion d'acétone cyanohydrine est supérieure. Ce phénomène serait lié à la diminution plus rapide du pH qui entraîne, comme COOKE (1978) l'a démontré, un ralentissement de la dissociation de l'acétone cyanohydrine en acétone et HCN.

Il apparaît ici que la quantité de linamarase endogène du manioc, libérée lors de l'étape de râpage, est suffisante pour permettre une hydrolyse très rapide et totale de la linamarine, malgré la diminution de cette activité enzymatique observée au cours du temps (cf. fig. 4.33). Dans le cas des fermentations avec inoculation, cette diminution est plus significative. Elle peut être associée à une hydrolyse de la linamarase par des protéases produites par *L. plantarum* ou à la baisse de pH plus importante et plus rapide pouvant entraîner une dénaturation supérieure de la linamarase endogène du manioc.

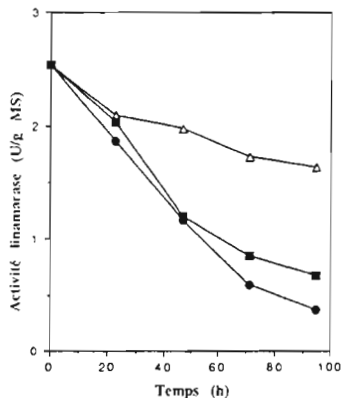


Figure 4.33 : Evolution de l'activité linamarase endogène durant la fermentation du manioc. Fermentation naturelle (Δ); Inoculation avec *L. plantarum* A6 (●); Inoculation avec *L. plantarum* Lactolabo (■).

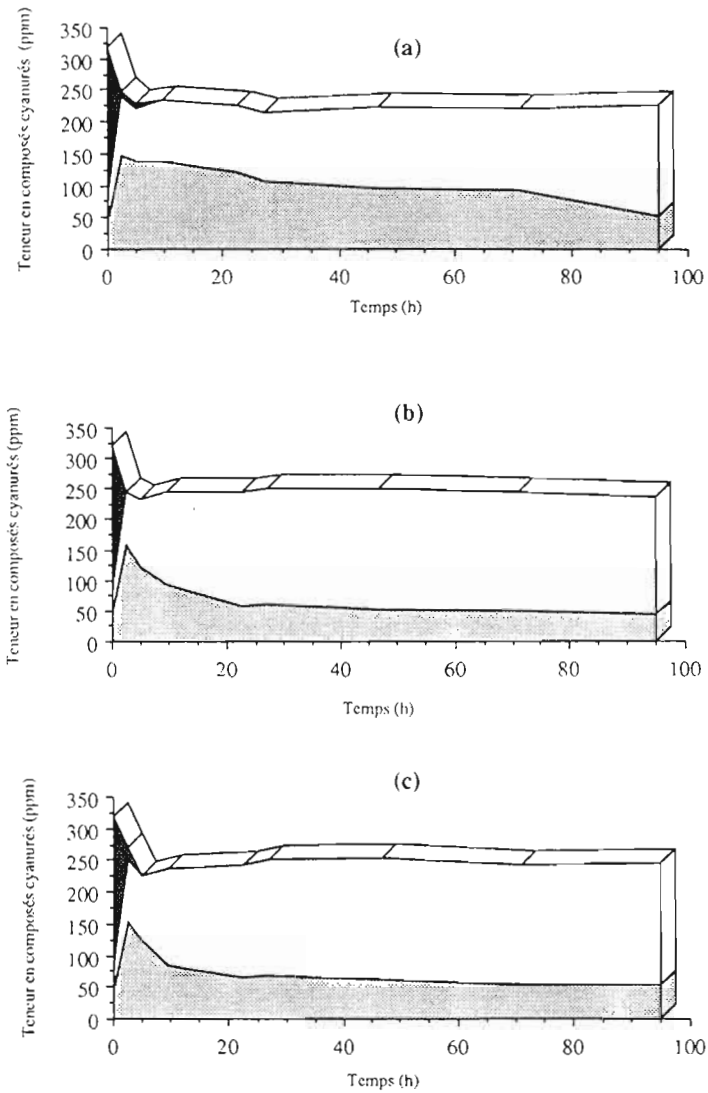


Figure 4.32 : Evolution des teneurs en linamarine (■), cyanohydrine (□) et HCN (▨) durant la fermentation du gari, exprimées en équivalent CN⁻. Fermentation naturelle (a) ; Inoculation avec *L. plantarum* A6 (b) ; Inoculation avec *L. plantarum* Lacto Labo (c).

Observation au microscope électronique à balayage (MEB)

L'observation microscopique des différents essais à différents temps de fermentation, a été réalisée pour, d'une part, déterminer l'homogénéité ou l'hétérogénéité de la microflore présente, et d'autre part, observer si l'inoculation avec la souche amylolytique entraînait une modification de la structure des grains d'amidon.

Nous pouvons observer au temps T_0 , que les cellules végétales sont remplies de grains d'amidon : la surface de ces grains est alors parfaitement lisse (cf. Photo 4.5 et 4.6). Aucun microorganisme n'est observé.

Au cours de la fermentation naturelle, on constate que très peu de bactéries sont présentes, quelque soit le temps de fermentation. Seules, quelques cellules en formes de coques associées en courtes chaînes ainsi que quelques bacilles, peuvent être mis en évidence (cf. photo 4.7 et 4.8). Cette faible densité de microorganismes ne reflète pas la forte population dénombrée sur boîte de Pétri. Nous observons par ailleurs que la surface des grains d'amidon et des bactéries présente un aspect inhabituel (rugueux).

Au cours des fermentations avec inoculation, la population de microorganismes apparaît dense et très homogène. Elle est constituée de petits bacilles de taille identique, correspondant à des cellules de *L. plantarum* (cf. photo 4.9, 4.10 et 4.11). Les grains d'amidon restent parfaitement lisses et ne présentent pas les rugosités précédemment observées pour la fermentation naturelle.

Notons que SAUCEDO *et al.* (1992) avaient observé que la technique de fixation des échantillons pouvait modifier la structure des cellules. Ainsi, la fixation au formaldéhyde donnait aux levures un aspect rugueux, celles ci présentaient de plus de nombreux débris à leur surface, alors qu'après fixation au glutaraldéhyde, elles apparaissaient parfaitement lisses. L'aspect rugueux des grains d'amidon et des bactéries au cours de la fermentation naturelle peut ainsi être dû à un artefact lié au choix de la technique de fixation au formaldéhyde pour notre étude. Il pourrait résulter de la précipitation au cours de la fixation, de protéines, polysaccharides ou autres métabolites produits par la microflore naturelle. L'utilisation d'autres techniques de fixation permettrait de vérifier cette dernière hypothèse.

Signalons enfin que pour les échantillons de manioc inoculés avec *L. plantarum* A6, nous avons relevé la présence de quelques grains d'amidon, très isolés, présentant une surface poreuse (cf. photo 4.12). On ne peut cependant affirmer que cet aspect particulier résulte d'une attaque enzymatique, car le nombre de grains observés présentant une telle modification est très faible. Notons à ce sujet que la capacité des bactéries d'hydrolyser efficacement les grains d'amidon brut est une propriété peu fréquente. DETTORI-CAMPUS *et al.* (1992) n'ont retrouvé en effet cette caractéristique que chez les souches de *B. stearothermophilus* et *B. amylolyticus* bien qu'ils aient testé 88 souches de *Bacillus* amylolytiques regroupant 18 espèces.

Résultats et discussion

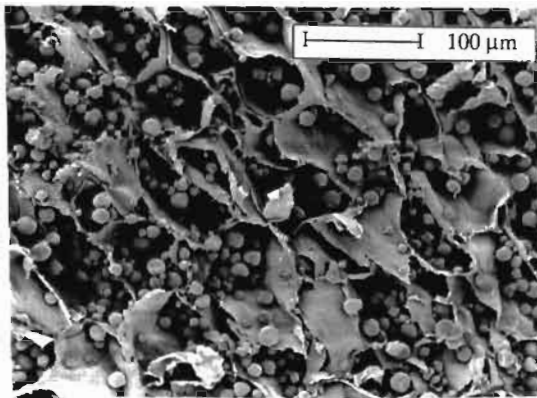


Photo 4.5 : Aspect général des cellules végétales de manioc au temps initial.

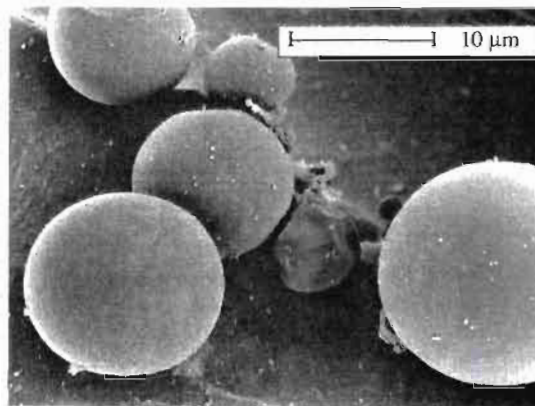


Photo 4.6 : Aspect des grains d'amidon de manioc au temps initial.

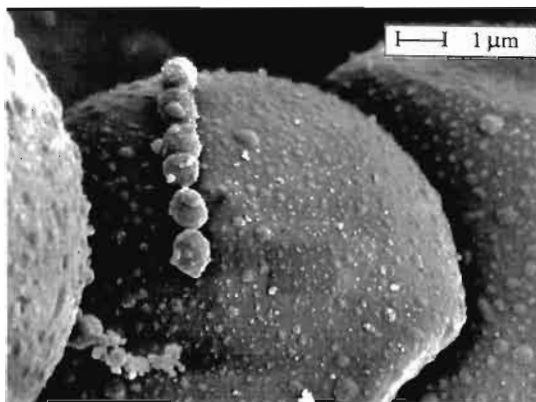


Photo 4.7 : Bactéries observées au cours de la fermentation naturelle après 2 jours.

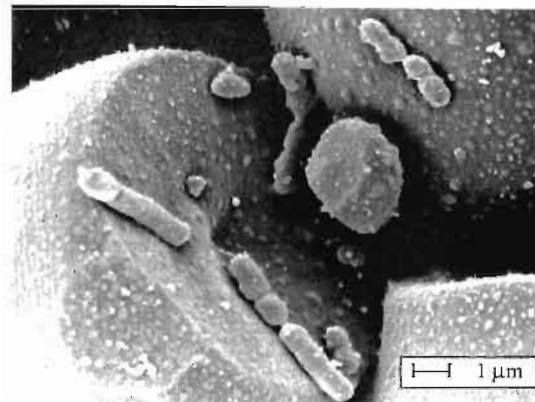


Photo 4.8 : Bactéries observées au cours de la fermentation naturelle après 4 jours.

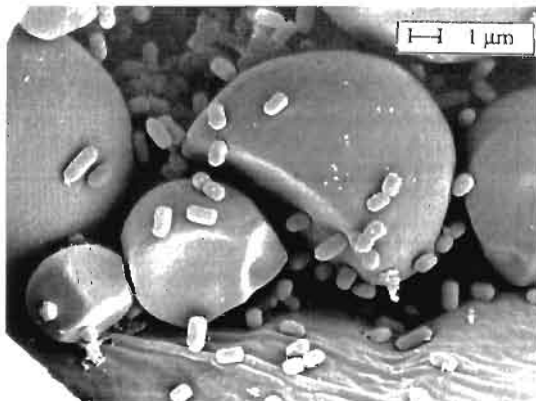


Photo 4.9 : Bactéries observées au cours de la fermentation du manioc inoculé avec *L. plantarum* (Lacto Labo), après 2 jours.

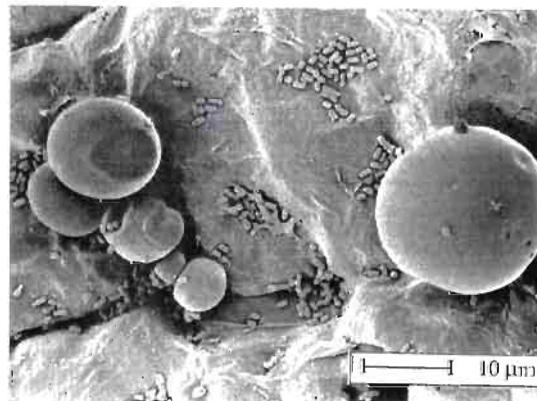


Photo 4.10 : Bactéries observées au cours de la fermentation du manioc inoculé avec *L. plantarum* A6, après 2 jours.

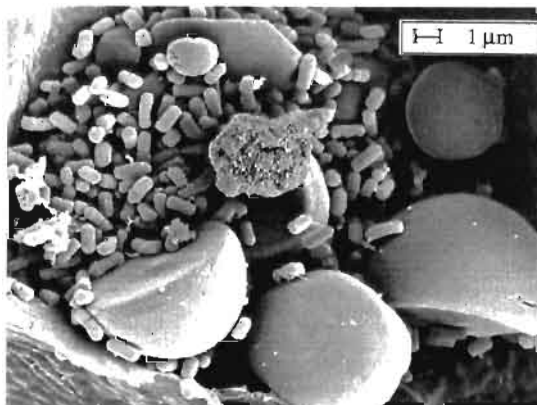


Photo 4.11 : Bactéries observées au cours de la fermentation du manioc inoculé avec *L. plantarum* A6, après 4 jours.

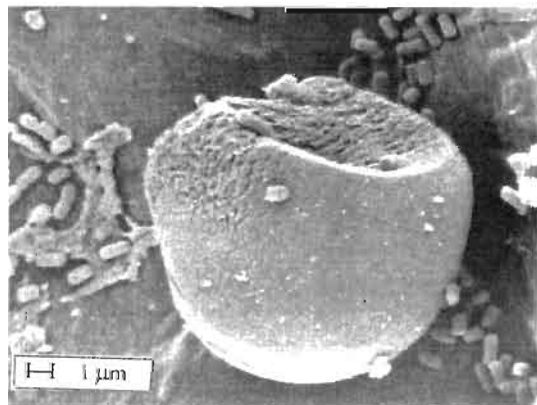


Photo 4.12 : Grain d'amidon observé au cours de la fermentation du manioc inoculé avec *L. plantarum* A6, après 4 jours.

4.5.4 - Conclusion

La souche *L. plantarum* A6 cultivée sur un milieu à base de cellobiose, présente un taux de croissance de $0,41 \text{ h}^{-1}$, un rendement en biomasse de $0,23 \text{ g/g}$ et produit simultanément une linamarase ($76,4 \text{ U/g}$ de cellules) et une amylase (36 U/ml). Il a été démontré que la biosynthèse de ces deux enzymes était réprimée par le glucose.

L'utilisation d'une telle souche comme starter de la fermentation du manioc, semble améliorer le profil d'acidification et nous permet d'envisager de raccourcir la durée de la fermentation à 24 h. Cependant, cela ne semble pas apporter d'amélioration significative au niveau de la détoxification du manioc, et présente même un effet antagoniste. Il ressort de notre étude, que la quantité de linamarase endogène libérée lors de l'étape de râpage est suffisante pour permettre une dégradation totale et rapide de la linamarine. Ce résultat rejoint celui de VASCONCELOS *et al.* (1990), qui observaient que 95% de la linamarine initiale étaient hydrolysés trois heures après l'étape de râpage. Néanmoins, il diffère de ceux présentés par IKEDIOBI et ONYIKE (1982a et b) et OKAFOR et EJIOFOR (1990) qui montraient que l'ajout de linamarase ou l'inoculation avec une souche ayant une activité linamarase pouvait améliorer la détoxification, ainsi que de ceux de MAOPOOG *et al.* (1989), qui mettaient en évidence que la quantité de linamarase endogène était insuffisante pour permettre l'hydrolyse complète des glucosides cyanogéniques.

Ces différences peuvent s'expliquer par l'utilisation de variétés de manioc possédant des niveaux plus ou moins importants en linamarase endogène, ou bien encore par l'utilisation d'une technique non traditionnelle de préparation du manioc. L'étape de râpage des racines, réalisée dans notre étude à l'aide d'un mixer, a probablement provoqué une destruction plus complète de la structure végétale et favorisé la mise en contact de l'enzyme avec la linamarine. Le rôle exact de *L. plantarum* dans le processus de détoxification du manioc, devrait donc être apprécié à partir d'essais réalisés dans des conditions réelles de préparation.

En ce qui concerne les autres paramètres physico-chimiques et microbiologiques, il apparaît que l'inoculation du manioc avec une souche de *L. plantarum* entraîne : le passage d'un profil fermentaire hétérolactique caractéristique de la fermentation naturelle, à un profil homolactique ; une baisse plus importante et rapide du pH (pH 3,8) ; une production supérieure d'acide lactique. Le caractère amylolytique de *L. plantarum* A6 permet d'augmenter la teneur finale en acide lactique jusqu'à $5 \text{ g}/100 \text{ g MS}$.

Ces derniers points suggèrent que l'utilisation de *L. plantarum* A6 comme starter, pourrait jouer un rôle significatif dans le développement des qualités organoleptiques mais aussi dans la standardisation et la préservation du produit final obtenu, grâce aux fortes quantités d'acide lactique produites par la souche et la baisse plus rapide et importante du pH qui en résulte.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Dans la plupart des procédés traditionnels de transformation des racines de manioc intervient une étape de fermentation lactique qui est associée directement ou indirectement à la détoxification, à la conservation et à l'obtention des qualités organoleptiques des divers aliments obtenus. Cependant, cette fermentation étant liée au développement d'une microflore épiphyte dans des conditions non contrôlées, les qualités de ces aliments sont particulièrement variables.

C'est dans ce contexte qu'un programme CEE "Amélioration des aliments fermentés à base de manioc" a été mis en place. Il s'agissait de mieux comprendre les phénomènes de transformation intervenant au cours de leur élaboration et, sur la base de ces connaissances, de dégager des stratégies de fabrication adéquates pour obtenir des aliments de meilleure qualité.

L'étude réalisée ici avait pour objectif d'exploiter au mieux les propriétés métaboliques des bactéries lactiques afin d'assurer la maîtrise de l'étape de fermentation.

Dans le cas du gari, un aliment typique d'Afrique de l'Ouest utilisé dans cette étude comme modèle, il apparaissait nécessaire de favoriser au cours de la fermentation : une acidification rapide de la pulpe de manioc par une production élevée d'acide lactique et une détoxification par la dégradation des composés cyanogéniques (linamarine). L'hypothèse formulée initialement était de considérer que l'utilisation de starter de bactéries lactiques se caractérisant par des propriétés physiologiques et métaboliques particulières (acido-tolérance, caractère homolactique, production de linamarase, amylase...) permettrait d'atteindre ces objectifs.

Dans ce but, nous avons tout d'abord étudié les caractéristiques de croissance et de production d'acide lactique d'un certain nombre de souches appartenant aux quatre principaux genres de bactéries lactiques. Parmi les souches testées, *Lactobacillus plantarum* s'est avéré très rapidement être la souche la plus appropriée en raison de ses caractéristiques : acido-tolérance, croissance rapide, production élevée de biomasse et d'acide lactique. En vue d'optimiser la production de biomasse de ce microorganisme, sa physiologie a été plus spécifiquement étudiée (GIRAUD *et al.*, 1991b). Cependant, d'autres propriétés devaient être recherchées : d'une part, la capacité à transformer l'amidon en acide lactique, afin d'en augmenter la teneur dans la pulpe, et d'autre part, la capacité à dégrader la linamarine, afin de réduire la toxicité.

Notre étude s'est donc orientée par la suite, vers la sélection de bactéries lactiques amylolytiques. Des isollements effectués au Congo sur des échantillons de manioc en cours de

Conclusion générale

rouissage, ont permis l'isolement d'une bactérie, identifiée comme une souche de *L. plantarum* (répertoriée *L. plantarum* A6) possédant une très forte activité amylolytique (GIRAUD *et al.*, 1991a). Cette caractéristique nous a conduits à approfondir d'avantage nos travaux sur la physiologie de ce microorganisme. Nous avons pu mettre ainsi en évidence que cette souche avait un taux de croissance et un rendement en biomasse élevés tout à fait comparables à ceux d'une souche industrielle de *L. plantarum* (Lacto Labo). Sur la base de ces données, l'emploi de cette bactérie comme starter pour la bioconversion des aliments amylacés semble tout à fait envisageable.

En raison du caractère exceptionnel de la présence d'une amylase chez *L. plantarum*, nous avons entrepris la caractérisation de cette enzyme (GIRAUD *et al.*, 1992a). Les résultats obtenus ont montré qu'il s'agissait d'une α -amylase extra-cellulaire présentant des caractéristiques très proches de l'amylase de *Bacillus subtilis*. Il serait intéressant à ce niveau d'approfondir le lien de parenté existant entre ces deux enzymes notamment par l'emploi de technique d'immunoblotting.

La dégradation de la linamarine étant considérée comme l'étape primordiale et limitante dans le procédé de détoxification du manioc, nous avons été amenés à étudier la capacité des bactéries lactiques à dégrader ce composé (GIRAUD *et al.*, 1992b). Nous avons pu démontrer au cours de cette étude, la très bonne résistance des bactéries lactiques aux cyanures ainsi que la présence d'activités linamarase et aryl- β -glucosidase pour certaines souches. Parmi l'ensemble des bactéries testées, la plus forte activité linamarase mesurée a été retrouvée pour les souches de *L. plantarum*. Enfin, les diverses observations que nous avons faites tendent à montrer que *L. plantarum* A6 posséderait deux systèmes enzymatiques différents permettant l'hydrolyse des β -glucosides. Sur la base de nos résultats, il serait intéressant de purifier ces enzymes afin de mieux les caractériser. En effet, la linamarase de *L. plantarum* A6 semble présenter des propriétés différentes des linamarases d'origine végétale, notamment au niveau de sa spécificité. De plus, l'hydrolyse des β -glucosides par des systèmes enzymatiques ATP-Mg²⁺ dépendants est peu commune.

Enfin, étant donné la capacité de cette souche à dégrader simultanément la linamarine et l'amidon, nous avons étudié les effets de l'inoculation massive de cette bactérie, dans des conditions physiologiques optimales, sur la fermentation naturelle des racines de manioc (GIRAUD *et al.*, 1992c). Nos résultats ont montré que le développement de la microflore naturelle pouvait être supplanté par celui de *L. plantarum* A6. De plus, il apparaît que l'inoculation par cette souche pourrait jouer un rôle significatif dans le développement des qualités organoleptiques mais aussi dans l'élaboration et la conservation du produit final obtenu. En revanche, l'utilisation d'une souche possédant une activité linamarase, ne semble pas apporter d'amélioration sur la détoxification, la quantité de linamarase endogène du manioc apparaissant suffisante pour assurer une hydrolyse rapide et totale de la linamarine. Il est important cependant de souligner que ces derniers essais ont été réalisés au niveau du laboratoire, dans des conditions non artisanales. Des

Conclusion générale

essais, en conditions réelles de fabrication, couplés à une analyse nutritionnelle approfondie seraient donc nécessaires pour juger des améliorations effectives que pourrait apporter l'utilisation d'un tel starter dans la fabrication du gari. Il conviendrait par ailleurs d'évaluer si l'utilisation d'un mutant de la souche *L. plantarum* A6 ne produisant que de l'acide L(+) lactique améliorerait la qualité nutritionnelle du produit final.

Au niveau des autres procédés de transformation du manioc, le choix de *L. plantarum* A6 comme starter est discutable. En effet, les points-clés à résoudre pour permettre un meilleur contrôle du procédé de fabrication, sont spécifiques à chacun des produits. Citons quelques exemples :

- pour la chicouangue, aliment traditionnel du Congo, il semble que le problème de rouissage des tubercules se situe non pas au niveau de la détoxication mais plutôt au niveau de la dégradation des parois cellulaires végétales par l'action de cellulases et de pectinases. L'utilisation de bactéries lactiques pectinolytiques ou cellulolytiques serait plus appropriée dans ce cas,

- pour l'amidon aigre, produit largement consommé en Amérique Latine, le problème majeur se situe au niveau de la structure et des caractéristiques de l'amidon. En effet, celui-ci devient panifiable après plus d'un mois de fermentation. La relation existant entre la phase de fermentation et la qualité du produit qui contient essentiellement de l'acide lactique comme produit de fermentation, n'est pas encore connue. Mr RAIMBAULT (communication personnelle) suggère que certaines souches de *Leuconostoc* produiraient des polysaccharides entraînant des modifications physico-chimiques de l'amidon et le rendant ainsi panifiable.

Néanmoins, d'autres domaines d'application de *L. plantarum* A6 peuvent être envisagés, notamment :

- dans l'alimentation animale, par l'amélioration de l'ensilage de la paille, de la pulpe de café ou d'autres résidus végétaux.

- dans la dépollution des eaux résiduelles des amidonneries à base de manioc (procédé largement exploité au Brésil). par la diminution de la charge organique et surtout de la forte teneur en linamarine.

Les applications de *L. plantarum* A6 apparaissent ainsi multiples. Elles impliquent plusieurs développements que nous suggérons et qui s'avèrent essentiels pour résoudre certains aspects de l'alimentation dans les pays tropicaux. Par ailleurs, l'isolement de cette bactérie révèle que les fermentations traditionnelles peuvent constituer un biotope de choix pour la découverte de souches de bactéries lactiques atypiques. Une voie intéressante novatrice serait la recherche de souches produisant de nouvelles bactériocines, dans l'optique de trouver un moyen de lutte efficace contre les maladies diarrhéiques qui constituent un fléau des populations de nombreux pays en voie de développement.

Conclusion générale

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- ABALAKA, J. A., GARBA, S. A. (1989) Influence of media composition on linamarase production by some fungi. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 561-563.
- ABE, M. O., LINDSAY, R. C. (1978) Evidence for a lactic streptococcal role in nigerian acidic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) fermentations. *J. Food Protection*, **41**, 781-784.
- AKINRELE, I. A. (1964) Fermentation of cassava. *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 589-594.
- ALEXANDER, J. K. (1968) Purification and specificity of cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum*. *J. Biol. Chem.*, **243**, 2899-2904.
- BAIRD PARKER, A. C. (1980) Organics acids. In "Microbial Ecology of Foods", 1, ICMSE (Ed), Academic Press, New-York.
- BARMAN, E. (1969) Enzyme handbook. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, **2**, pp. 560-564.
- BAUCHOP, T., ELSDEN, S. R. (1960) The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.*, **23**, 457-469.
- BELAICH, J. P. (1986) Le rendement de la croissance et la biomasse active dans les biotopes anaérobies. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **26**, 137-153.
- BELAICH, J. P., BELAICH, A., SIMONPIETRI, P. (1972) Uncoupling in bacterial growth : effect of pantothenate starvation on growth of *Zymomonas mobilis*. *J. Gen. Microbiol.*, **70**, 179-185.
- BELIARD, E., THUAULT, D. (1989) Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. In "Microbiologie alimentaire". Bourgeois C.M., Larpent J.P. (Eds). Lavoisier Paris, **2**, pp. 283-297.
- BELIARD, E., THUAULT, D., BOURGEOIS, C. (1991) Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques : application à la conservation des produits carnés. Actes du Colloque lactique 91 (Caen, France, 12-13 septembre 1991), pp. 205-212.
- BIBAL, B., GOMA, G., VAYSSIER, Y., PAREILLEUX, A. (1988) Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris* : a kinetic study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 340-344.
- BLAHA, G., PARIS, N. (1987) Examen en microscopie électronique de l'aspect externe des cabosses du cacaoyer saines ou infectées par *Phytophthora megakarya*. *Café Cacao Thé*, **31**, 23-34.

- BLONDIN, B., GONDE, P., RATOMAHENINA, R., ARNAUD, A., GALZY, P. (1984) A study of cyanide-insensitive respiration in the genus *Dekkera* and *Brettanomyces*. *Microbiol Immunol.*, **28**, 637-644.
- BLONDIN, B., RATOMAHENINA, R., ARNAUD, A., GALZY, P. (1983) Purification and properties of the β -glucosidase of a yeast capable of fermenting cellobiose to ethanol : *Dekkera intermedia* van der Walt. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 1-6.
- BORCH, E., BERG, H., HOLST, O. (1991) Heterolactic fermentation by a homofermentative *Lactobacillus sp.* during glucose limitation in anaerobic continuous culture with complete cell recycle. *J. Appl. Bacteriol.*, **71**, 265-269.
- 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 d'un programme CEE-STD2 (contrat N°TS2A-0226). 54 p.
- BRINK, B. T., KONINGS, W. N. (1982) Electrochemical proton gradient and lactate concentration gradient in *Streptococcus cremoris* cells grown in batch. *J. Bacteriol.*, **152**, 682-686.
- BRINK, B. T., OTTO, R., HANSEN, V. P., KONINGS, W. N. (1985) Energy recycling by lactate in growing and nongrowing cells of *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.*, **162**, 383-390.
- 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.
- BRINK, T. B., HUIS IN'T VELD, J. H. J. (1991) Application of metabolic properties of lactic acid bacteria. Actes du Colloque lactic 91 (Caen, France, 12-13 septembre 1991). pp. 67-76.
- BROOK, E. J., STANTON, W. R., WALLBRIDGE, A. (1969) Fermentation methods for protein enrichment of cassava. *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 1271-1288.
- BRUGIDOU, C., ROCHER, A., GIRAUD, E., LELONG, B., MARIN, B., RAIMBAULT, M. (1991) A new high performance liquid chromatographic technique for separation and determination of adenylic and nicotinamide nucleotides in *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnol. Tech.*, **5**, 475-478.
- BUCHANAN, C. J., MITCHELL, W. J. (1992) Two β -glucosidase activities in *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 243-250.
- BUTLER, G. W. (1965) The distribution of the cyanoglucosides linamarin and lotaustralin in higher plants. *Phytochemistry*, **4**, 127-131.

- BUTLER, G. W., BAILEY, R. W., KENNEDY, L. D. (1965) Studies on the glucosidase "linamarase". *Phytochemistry*, **4**, 369-381.
- CARDENAS, O. S., BUCKLE, T. S. (1980) Sour cassava starch production : a preliminary study. *J. Food Sci.*, **45**, 1509-1512.
- CASTRIC, P. A., STROBEL, G. A. (1969) Cyanide metabolism by *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4089-4094.
- CHAMP, M., SZYLIT, O., RAIBAUD, P., AIT-ABDELKADER, N. (1983) Amylase production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. *J. Appl. Bacteriol.*, **55**, 487-493.
- CHEW, M. Y. (1973) Rhodanese in higher plants. *Phytochemistry*, **12**, 2365-2367.
- CHUZEL, G. (1985) Ligne de transformation du manioc en gari : influence des traitements technologiques sur l'élimination des composés cyanogénétiques. Rapport CEEMAT/CIRAD, 40 p.
- CHUZEL, G., GRIFFON, D. (1987) Le gari : un produit traditionnel fermenté à base de manioc. Rapport CEEMAT / CIRAD. 12 p.
- CHUZEL, G., GRIFFON, D. (1989) Le gari. In "Microbiologie alimentaire". Bourgeois C.M., Larpent J.P. (Eds). Lavoisier Paris. **2**, pp. 175-187.
- COCK, J. H. (1982) Cassava : a basic energy source in the tropics. *Science*, **218**, 755-762.
- COGAN, T. M. (1980). Les levains lactiques mésophiles. Une revue. *Le Lait*, **60**, 397-425.
- COLLARD, P., LEVI, S. (1959) A two-stage fermentation of cassava. *Nature*, **183**, 620-621.
- CONN, E. E. (1969) Cyanogenic glycosides. *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 519-526.
- CONN, E. E. (1979) Biosynthesis of cyanogenic glycosides. *Naturwissenschaften*, **66**, 28-34.
- CONN, E. E. (1980) Cyanogenic compounds. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 433-451.
- COOKE, R. D. (1978) An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 345-352.
- COOKE, R. D., BLAKE, G. G., BATTERSHILL, J. M. (1978b) Purification of cassava linamarase. *Phytochemistry*, **17**, 381-383
- COOKE, R. D., COCK, J. (1989) Cassava crops up again. *New Scientist*, **1669**, 63-68.

- COOKE, R. D., COURSEY, D. G. (1981) Cassava : a major cyanide-containing food crop. In "Cyanide in biology". Vennesland B., Conn E.E., Knowles C.J., Westley J., Wissing, F. (Eds). Academic Press London, pp. 93-114.
- COOKE, R. D., DE LA CRUZ, E. (1982) An evaluation of enzymic and autolytic assays for cyanide in cassava (*Manihot esculenta*. Crantz). J. Sci. Food Agric., **33**, 1001-1009.
- COOKE, R. D., HOWLAND, A. K., HAHN, S. K. (1978a) Screening cassava for low cyanide using an enzymatic assay. Expl. Agric., **14**, 367-372.
- CORLETT, D. A., BROWN, M. (1980) pH and acidity. In "Microbial Ecology of Foods", ICMF (Ed), Academic Press. New-York.
- COTTA, M. A. (1988) Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 772-776.
- CUZIN, N. (1991) Fermentation méthanique des épiluchures de manioc. Influence et dégradation du cyanure. Thèse de Doctorat. Université de Provence, Aix-Marseille I, 134 p
- CUZIN, N., FARINET, J. L., SEGRETAI, C., LABAT, M. (1992) Methanogenic fermentation of cassava peel using a pilot plug flow digester. Bioresource Technol., **41**, 259-264.
- CUZIN, N., LABAT, M. (1992) Reduction of cyanide levels during anaerobic digestion of cassava. Int. J. Food Sci. Technol., **27**, 329-336.
- DAESCHEL, M. A. (1989) Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. Janvier, 164-167.
- DAUBRESSE, P., NTIBASHIRWA, S., GHEYSEN, A., MEYER, J. A. (1987) A process for protein enrichment of cassava by solid substrat fermentation in rural conditions. Biotechnol. Bioeng., **29**, 962-968.
- DE BRUIJN, G. H. (1971) A study of the cyanogenic character of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Mededelingen Landbouwhogeschool, Wageningen, Nederland. 71-13, pp. 1-140.
- DE BRUIJN, G. H., FRESCO, L. O. (1989) The importance of cassava in world food production. Netherlands J. Agric. Sci., **37**, 21-34.
- DELANGE, F., VAN DER VELDEN, M., ERMANS, A. M. (1973) Evidence of an antithyroid action of cassava in man and in animals. In "Chronic Cassava Toxicity" Nestel B., Mac Intyre R. (Eds), IDRC Ottawa, Canada, pp.147-151.
- DE MAN, J. C., ROGOSA, M., SHARPE, M. E. (1960) A medium for the cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bacteriol., **23**, 130-135.

- DETTORI-CAMPUS, B. G., PRIEST, F. G., STARK, J. R. (1992) Hydrolysis of starch granules by the amylase from *Bacillus stearothermophilus* NCA 26. *Process Biochem.*, **27**, 17-21.
- DE VRIES, W., KAPTEIJN, W. M. C., VAN DER BEEK, E. G., STOUTHAMER, A. H. (1970) Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and in continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.*, **63**, 333-345.
- DILLEMANN, G. (1958) Composés cyanogénétiques. In "Ruhland W, handbuch der Pflanzen physiologie". Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg. Bd VIII, pp. 1050-1075
- DIVIES, C. (1991) Le métabolisme de l'acide citrique par les bactéries lactiques. Actes du Colloque lactique 91 (Caen, France. 12-13 septembre 1991), pp. 103-119.
- DOUGAN, J., ROBINSON, J. M., SUMAR, S., HOWARD, G., COURSEY, D. G. (1983) Some flavouring constituents of cassava and of processed cassava products. *J. Sci. Food Agric.*, **34**, 874-884.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- DUFOUR, D. L. (1988) Cyanide content of cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) cultivars used by tukanoan indians in Northwest Amazonia. *Economic botany*, **42**, 255-266.
- DUNN, M. A., HUGUES, M. A., SHARIF, A. L. (1988) Synthesis of the cyanogenic β -glucosidase, linamarase, in white clover. *Arch. Biochem. Biophys.*, **260**, 561-568.
- DUNSTAN, W. R., HENRY, T. A., AULD, S. J. M. (1906) Cyanogenesis in plant. The occurrence of phaseolunatin in cassava (*Manihot aipi* and *Manihot utilissima*). *Proc. Roy. Soc. London*, B **78**, 152-158.
- EKSITTIKUL, T., CHULAVATNATOL, M. (1988) Characterization of cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Arch. Biochem. Biophys.*, **266**, 263-269.
- EZEALA, D. O. (1984) Changes in the nutritional quality of fermented cassava tuber meal. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 467-469.
- FAN, T. W. M., CONN, E. E. (1985) Isolation and characterization of two cyanogenic β -glucosidases from flax seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, **243**, 361-373.
- FAO (1990) *Statistic series, Yearbook*. FAO, **44**, pp. 94-95.

- FISCHER, E. H., STEIN, E. A. (1960) α -amylases. In "The Enzymes". Boyer P.D., Lardy H., Myrbäck K. (Eds). Academic Press. New York London. 4. pp. 313-343.
- FOGARTY, W. M. (1983) Microbial amylases. In "Microbial Enzymes and Biotechnology". Fogarty W.M. (Ed). Applied Science Publishers, London New York, pp. 1-92.
- FOMUNYAM, R. T., ADEGBOLA, A. A., OKE, O. L. (1985) Technical note : the stability of cyanohydrins. Food chem., 17, 221-225.
- FRANZL, S., ACKERMANN, I., NAHRSTEDT, A. (1989) Purification and characterization of a β -glucosidase (linamarase) from the haemolymph of *Zygaena trifolii* esper, 1783 (Insecta, Lepidoptera). Experientia, 45, 712-718.
- FRIEDMAN, M. R., GADEN, E. L. (1970) Growth and acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in dialysis culture system. Biotechnol. Bioeng., 12, 961-974.
- GHILDYAL, N. P., LONSANE, B. K. (1990) Utilization of cassava fibrous residue for the manufacture of value-added products : an economic alternative to waste treatment. Process Biochem., April, 35-39.
- GIRAUD, E., BRAUMAN, A., KELEKE, S., LELONG, B., RAIMBAULT, M. (1991a) Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 379-383.
- GIRAUD, E., GOSSELIN, L., MARIN, B., PARADA, J. L., RAIMBAULT, M. (1992a) Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. J. Appl. Bacteriol. (sous presse).
- GIRAUD, E., GOSSELIN, L., RAIMBAULT, M. (1992b) Degradation of cassava linamarin by lactic acid bacteria. Biotechnol. Lett., 14, 593-598.
- GIRAUD, E., GOSSELIN, L., RAIMBAULT, M. (1992c) Production of a *Lactobacillus plantarum* starter with linamarase and amylase activities for cassava fermentation. J. Sci. Food Agric. (sous presse).
- GIRAUD, E., LELONG, B., RAIMBAULT, M. (1991b) Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol, 36, 96-99.
- GRABNITZ, F., STAUDENBAUER, W. L. (1988) Characterization of two β -glucosidase genes from *Clostridium thermocellum*. Biotechnol. Lett., 10, 73-78.
- GRACE, M. R. (1978) Traitement du manioc. Collection FAO, Rome : production végétale et protection des plantes. 3, 163 p.

- GRIFFON, D., GAUTHIER, P. (1984) Industrialisation agro-alimentaire en PVD - Technologies appropriées et réduction d'échelle ; application à la transformation du manioc. Texte Salon du GIA. Paris.
- HARRIS, R., KNOWLES, C. J. (1983) Isolation and growth of a *Pseudomonas* species that utilizes cyanide as a source of nitrogen. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1005-1011.
- HEMME, D., BOUILLANNE, C., METRO, F., DESMAZEAUD, M. J. (1982). Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. *Sci. Aliments*. **2**. 113-123.
- HRUSKA, A. J. (1988) Cyanogenic glucosides as defense compounds - a review of the evidence. *J. Chem. Ecol.* **14**, 2213-2217.
- IKEDIOBI, C. O., IBRAHIM, S., OGBONNA, A. I. (1987) Linamarase from *Fusarium equiseti*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **25**, 327-333.
- IKEDIOBI, C. O., OGUNDU, E. C., UKOHA, A. I. (1985) Production of linamarase by *Aspergillus sydowi* and *Fusarium equiseti*. *Process Biochem.*, August. 99-102.
- IKEDIOBI, C. O., ONYIA, G. O. C., ELUWAH, C. E. (1980) A rapid and inexpensive enzymatic assay for total cyanide in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and cassava products. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2803-2809.
- IKEDIOBI, C. O., ONYIKE, E. (1982a) Linamarase activity and detoxification of cassava (*Manihot esculenta*) during fermentation for gari production. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1667-1669.
- IKEDIOBI, C. O., ONYIKE, E. (1982b) The use of linamarase in gari production. *Process Biochem.* juillet, 2-5.
- INDIRA, P., MANUJAM, T. (1987) Distribution of hydrocyanic acid in a high cyanide and a low-cyanide variety of cassava in relation to the age of the plant. *Indian J. Agric. Sci.* **57**, 436-438.
- ISTOCK, U., LIEBEREI, R., HARM, S. H. (1990) Pattern of enzymes involved in cyanogenesis and HCN metabolism in cell cultures of *Phaseolus lunatus* L. varieties. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. **22**, 105-112.
- ITOH-NASHIDA, T., HIRAIWA, M., UDA, Y. (1987) Purification and properties of β -D-glucosidase (linamarase) from the butter bean, *Phaseolus lunatus*. *J. Biochem.* **101**, 847-854.
- IVOREC-SZYLIT, O., SZYLIT, M. (1965) Contribution à l'étude de la dégradation des glucides dans le jabot du coq. Mise en évidence et dosage des stéréo-isomères D et L lactates. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* **5**, 353-360.

- JENNINGS, D. L. (1970) Cassava in Africa. Field crop abstracts, **23**, 271-278.
- JORY, M. (1989) Etude de deux filières de transformation agro-alimentaire du manioc comportant une phase de fermentation. ENSIAA Massy-Montpellier, Thèse de Master. 63 p.
- KAKES, P. (1985) Linamarase and other β -glucosidases are present in the cell walls of *Trifolium repens* L. leaves. *Planta*, **166**, 156-160.
- KANDLER, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 209-224.
- KAPLAN, J. G., TACHEITER, W. (1966) The β -glucosidase of the yeast cell surface. *J. Gen. Physiol.*, **50**, 9-24.
- KEMP, T. L., NAZMUL, M. K., LINDEN, J. C. (1989) Response surface optimization of *Lactobacillus plantarum* batch growth. *Biotechnol. Lett.*, **11**, 817-820.
- KNOWLES, C. J. (1976) Microorganisms and cyanide. *Bacteriol. Rev.*, **40**, 652-680.
- KNOWLES, C. J., BUNCH, A. W. (1986) Microbial cyanide metabolism. *Adv. Microbial Physiol.*, **27**, 73-111.
- KONINGS, W. N., OTTO, R. (1983) Energy transduction and solute transport in streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 247-257.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LAW, B. A., KOLSTAD, J. (1983) Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 225-245.
- LEDESMA, O. V., DE RUIZ HOLGADO, A. P., OLIVER, G. (1977) A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, **42**, 123-133.
- LEGRAS, J. L., KAAKEH, M. R., ARNAUD, A., GALZY, P. (1989) Purification and properties of the β -glucosidase from a nitrile hydratase-producing *Brevibacterium* sp. strain R312. *J. Basic Microbiol.*, **29**, 655-669.
- LEVEAU, J. Y., BOUIX, M. (1980) La flore lactique. In "Techniques d'Analyses et de Contrôle dans les Industries Agroalimentaires". **3**. Le contrôle microbiologique. Bourgeois C.M., Leveau J.Y. (Eds). Technique documentation, Paris-ADRIA, Paris. pp. 106-129.

- LIEBEREI, R., SELMAR, D. (1990) Determination of rhodanese in plants. *Phytochemistry*, **29**, 1421-1424.
- LINDGREN, S., REFAI, O. (1984) Amyolytic lactic acid bacteria in fish silage. *J. Appl. Bacteriol.*, **57**, 221-228.
- LONVAUD-FUNEL, A. (1991) Métabolisme des bactéries lactiques dans le vin : la fermentation malolactique. Actes du Colloque lactic 91 (Caen, France, 12-13 septembre 1991), pp. 91-102.
- MADUAGWU, E. N., OBEN, H. E. (1981) Effects of processing on greated cassava roots by the screw press and by traditional fermentation methods on the cyanide content of gari. *J. Food Technol.* **16**, 299-302.
- MALONEY, P. C. (1977) Obligatory coupling between proton entry and the synthesis of adenosine 5'-triphosphate in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **132**, 564-575.
- MALONEY, P. C., HANSEN, F. C. (1982) Stoichiometry of proton movements coupled to ATP synthesis driven by a pH gradient in *Streptococcus lactis*. *J. Membrane Biol.*, **66**, 63-75.
- MAOPOOG, O., CHISM, G., SAYRE, R. (1989) Isolation of cassava linamarase : evidence that endogenous levels are insufficient for effective hydrolysis of linamarin. Report on the founding workshop for the cassava biotechnology research Network. CIAT document. 52. p. 25.
- MCDONALD, L. C., FLEMING, H. P., HASSAN, H. M. (1990) Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2120-2124.
- MCDONALD, L. C., MCFEETERS, R. F., DAESCHEL, M. A., FLEMING, H. P. (1987) A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1382-1384.
- MCKAY, A. M. (1992) Hydrolysis of vicine and convicine from fababeans by microbial β -glucosidase enzymes. *J. Appl. Bacteriol.*, **72**, 475-478.
- MEUSER, F., SMOLNIK, H. D. (1980) Processing of Cassava to Gari and other foodstuffs. *starch/stärke*, **32**, 116-122.
- MICHELS, P. A. M., MICHELS, J. P. J., BOONSTRA, J., KONINGS, W. N. (1979) Generation of electro-chemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end products. *FEMS Microbiol. Lett.*, **5**, 357-364.
- MILLER, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.

- MKPONG, O. E., YAN, H., CHISM, G., SAYRE, R. T. (1990) Purification, characterization and localization of linamarase in cassava. *Plant Physiol.*, **93**, 176-181.
- MONTGOMERY. (1969) Toxic constituents. In "Plant Foodstuffs." Liener I.E. (Ed), Academic Press London, pp. 143-157.
- MUCHNIK, J., VINCK, D. (1984) La transformation du manioc. technologies autochtones. Presses Universitaire de France. Paris. Agence de Coopération Culturelle, 172 p.
- MURPHY, M. G., O'CONNOR, L., WALSH, D., CONDON, S. (1985) Oxygen dependent lactate utilization by *Lactobacillus plantarum*. *Arch. Microbiol.*, **141**, 75-79.
- NAKAMURA, L. K. (1981) *Lactobacillus amylovorus*, a new starch hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **31**, 56-63.
- NAKAMURA, L. K., CROWELL, C. D. (1979) *Lactobacillus amylophilus*, a new starch hydrolysing species from swine waste corn fermentation. *Dev. Ind. Microbiol.*, **20**, 531-540.
- NAMBISAN, B., SUNDARESAN, S. (1985) Effect of processing on the cyanoglucoside content of cassava. *J. Sci. Food Agric.*, **36**, 1197-1203.
- NARTEY, F. (1968) Studies on cassava *Manihot utilisissima* Pohl-I. Cyanogenesis : the biosynthesis of linamarin and lotaustralin in etiolated seedlings. *Phytochemistry*, **7**, 1307-1312.
- NARTEY, F. (1973) Biosynthesis of cyanogenic glucosides in cassava (*Manihot* spp.). In "Chronic Cassava Toxicity". Nestel B.L., Mac Intyre R. (Eds), IRDC, Ottawa Canada, pp. 73-87.
- NGABA, P. R., LEE, J. S. (1979) Fermentation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Food Sci.*, **44**, 1570-1571.
- NWANKWO, D., ANADU, E., USORO, R. (1989) Cassava fermenting organisms. *MIRCEN J.*, **5**, 169-179.
- OAKLEY, B. R., KIRSH, D. R., MORRIS, N. R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **105**, 361-363.
- OFUYA, C. O., NNAJIOFOR, C. (1989) Development and evaluation of a starter culture for the industrial production of gari. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 37-42.
- OKAFOR, N. (1977) Micro-organisms associated with cassava fermentation for garri production. *J. Appl. Bacteriol.*, **42**, 279-284.

- OKAFOR, N., EJIOFOR, A. O. (1990) Rapid detoxification of cassava mash fermenting for garri production following inoculation with a yeast simultaneously producing linamarase and amy-lase. *Process Biochem.*, juin, 82-86.
- OKAFOR, N., EJIOFOR, M. A. N. (1985) The linamarase of *Leuconostoc mesenteroides* : production, isolation and some properties. *J. Sci. Food Agric.*, **36**, 669-678.
- OKAFOR, N., EJIOFOR, M. A. N. (1986) The microbial breakdown of linamarin in fermenting pulp of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), *MIRCEN J.*, **2**, 327-338.
- OKAFOR, N., IJIOMA, B., OYOLU, C. (1984) Studies on the microbiology of cassava retting for foo-foo production. *J. Appl. Bacteriol.*, **56**, 1-13.
- OKE, O. L. (1973) The mode of cyanide detoxification. In "Chronic Cassava Toxicity". Nestel B.L., Mac Intyre R. (Eds), IRDC, Ottawa Canada. pp. 97-104.
- OSUNTOKUN, B. O. (1972) Chronic cyanide neurotoxicity and neuropathy in nigerians. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **2**, 215-266.
- OTENG-GYANG, K. (1979) Etude de levures amylolytiques en vue de production de protéines d'organismes unicellulaires, Thèse Doctorat 3ème cycle. Université Montpellier II, 120 p.
- OTTO, R. (1984) Uncoupling of growth and acid production in *Streptococcus cremoris*. *Arch. Microbiol.*, **140**, 225-230.
- OTTO, R., LAGEVEEN, R. G., VELDKAMP, H., KONINGS, W. N. (1982) Lactate efflux-induced electrical potential in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.*, **149**, 733-738.
- OTTO, R., SONNENBERG, A. S. M., VELDKAMP, H., KONINGS, W. N. (1980) Generation of an electrochemical proton gradient in *Streptococcus cremoris* by lactate efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 5502-5506.
- OXENBURGH, M. S., SNOSWELL, A. M. (1965) Use of molar growth yields for the evaluation of energy-producing pathways in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, **89**, 913-914.
- OYEWOLE, O. B., ODUNFA, S. A. (1990) Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**, 145-152.
- PADMAJA, G., BALAGOPAL, C. (1985) Cyanide degradation by *Rhizopus oryzae*. *Can. J. Microbiol.*, **31**, 663-669.
- PALMER, R. E., ANDERSON, R. L. (1971) Cellobiose metabolism : a pathway involving adenosine 5'-triphosphate-dependent cleavage of the disaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45**, 125-130.

- PALMER, R. E., ANDERSON, R. L. (1972a) Cellobiose metabolism in *Aerobacter aerogenes* : Phosphorylation of cellobiose with adenosine 5'-triphosphate by a β -glucoside kinase. J. Biol. Chem., **247**, 3415-3419.
- PALMER, R. E., ANDERSON, R. L. (1972b) Cellobiose metabolism in *Aerobacter aerogenes* : Cleavage of cellobiose monophosphate by a phospho- β -glucosidase. J. Biol. Chem., **247**, 3420-3423.
- PHILBRICK, D. J., HILL, D. C., ALEXANDER, J. C. (1977) Physiological and biochemical changes associated with linamarin administration to rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., **42**, 539-551.
- POCSI, I., KISS, L., HUGHES, M. A., NANASI, P. (1989) Kinetic investigation of the substrate specificity of the cyanogenic β -D-glucosidase (linamarase) of white clover. Arch. Biochem. Biophys., **272**, 496-506.
- POOLMAN, B., DRIESSEN, A. J. M., KONINGS, W. N. (1987) Regulation of solute transport in Streptococci by the external and internal pH values. Microbiol. Rev., **51**, 498-508.
- RAIMBAULT, M., REVAH, S., PINA, F., VILLALOBOS, P. (1985) Protein enrichment of cassava by solid substrate fermentation using molds isolated from traditional foods. J. Ferment. Technol., **63**, 395-399.
- RAO, P. V., HAHN, S. (1984) An automated enzymic assay for determining the cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and cassava products. J. Sci. Food Agric., **35**, 426-436.
- REGEZ, P. F., SCHMIDT-LORENZ, W. (1988) Identification de bactéries isolées de la pâte de manioc et du pain de manioc (chikwangué) au Zaïre. Lebensmittel Technol., **21**, 66-69.
- REGEZ, P. F., ZORZI, N., NGOY, K., BALIMANDAWA, M. (1988) Evaluation de l'importance de quelques souches de *Lactobacillus* sp. pour l'acidification de différents aliments à base de manioc. Lebensmittel Technol., **21**, 288-293.
- REITER, B., ORAM, J. D. (1962) Nutritional studies on cheese starters. I- Vitamin and amino acid requirements of single strain starters. J. Dairy Res., **29**, 63-77.
- REUTER, G. (1985) Elective and selective media for lactic acid bacteria. Int. J. Food Microb., **2**, 55-68.
- RHEE, S. K., PACK, M. Y. (1980) Effect of environmental pH on fermentation balance of *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol., **144**, 217-221.
- ROBYT, J. F., ACKERMAN, R. J. (1973) Structure and function of amylase. II. Multiple forms of *Bacillus subtilis* α -amylase. Arch. Biochem. Biophys., **155**, 445-451.

- ROBYT, J. F., WHELAN, W. J. (1973) Amylases. In "Starch and its Derivatives" Radley J.A. (Ed) London : Chapman and Hall, pp. 423-429.
- ROLLINSON, G., JONES, R., MEADOWS, M. P., HARRIS, R. E., KNOWLES, C. J. (1987) The growth of a cyanide utilising strain of *Pseudomonas fluorescens* in liquid culture on nickel cyanide as a source of nitrogen. FEMS Microbiol. Lett., **40**, 199-205.
- SAKAI, T., YANASE, H., SAWADA, M., TONOMURA, K. (1981) Formation of β -cyanoalanine by cyanide resistant strain *Enterobacter* sp. 10-1. Agric. Biol. Chem., **45**, 2053-2062.
- SAITO, N. (1973). A thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. Arch. Biochem. Biophys., **155**, 290-298.
- SAUCEDO-CASTANEDA, G., GONZALEZ, P. B., REVAH, S. M., VINIEGRA, G. G., RAIMBAULT, M. (1990) Effect of Lactobacilli inoculation on Cassava (*Manihot esculenta*) silage : fermentation pattern and kinetic analysis. J. Sci. Food Agric., **50**, 467-477.
- SAUCEDO-CASTANEDA, G., LONSANE, B. K., NAVARRO, J. M., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M. (1992) Potential of using a single fermenter for biomass build-up, starch hydrolysis and ethanol production . Appl. Biochem. Biotechnol., **36**, 47-61.
- SHARPE, M. E. (1979) Lactic acid bacteria in the dairy industrie. J. Soc. Dairy Technol., **32**, 9-18.
- SCHEIRLINCK, T., MAHILLON, J., JOOS, H., DHAESE, P., MICHIELS, F. (1989) Integration and expression of α -amylase and endoglucanase genes in the *Lactobacillus plantarum* chromosome. Appl. Environ. Microbiol., **55**, 2130-2137. .
- SCHIMZ, K. L., BROLL, B., JOHN, B. (1983) Cellobiose phosphorylase (E.C. 2.4.1.20) of *Cellulomonas* : occurrence, induction, and its role in cellobiose metabolism. Arch. Microbiol., **135**, 241-249.
- SCHLIEMANN, W. (1983) β -D-glucosidasen (EC 3.2.1.21) der mikroorganismen. Pharmazie, **38**, 287-307.
- SEELY, M. K., CRIDDLE, R. S., CONN, E. E. (1966) The metabolism of aromatic compounds in higher plants. On the requirement of hydroxynitrile lyase for flavin. J. Biol. Chem., **241**, 4457-4462.
- SELMAR, D., LIEBEREI, R., BIEHL, B., VOIGT, J. (1987) *Hevea* linamarase : a nonspecific β -glycosidase. Plant Physiol., **83**, 557-563.

- SEN, S., CHAKRABARTY, S. L. (1984) Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. J. Ferment. Technol., **62**, 407-413.
- SEN, S., CHAKRABARTY, S. L. (1986) Amylase from *lactobacillus cellobiosus* D-39 isolated from vegetable wastes : purification and characterization. J. Appl. Bacteriol., **60**, 419-423.
- SHARPE, M.E. (1979) Lactic acid bacteria in the dairy industry. J. Soc. Dairy Technol., **32**, 9-18.
- SILVESTRE, P., ARRAUDEAU, M. (1983) Le manioc. Colection : Techniques Agricoles et Productions Tropicales, 1983, XXXII, ACCT, maisonneuve et Larose (Eds). 262 p.
- SNEATH, P. H. A. (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore. Vol. 2.
- SOCCOL, C. (1992) Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L+ lactique. Thèse de doctorat, UTC Compiègne. 218 p.
- TAGG, J. R., DAJANI, A. S., WANNAMAKER, L. W. (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev., **40**, 722-756.
- THOMAS, M., PRIEST, F. G., STARK, J. R. (1980) Characterization of an extracellular β -amylase from *Bacillus megaterium* sensu stricto. J. Gen. Microbiol., **118**, 67-72.
- THOMAS, T. D., PRITCHARD, G. G. (1987) Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. FEMS Microbiol. Rev., **46**, 245-268.
- VASCONCELOS, A. T., TWIDDY, D. R., WESTBY, A., REILLY, P. J. A. (1990) Detoxification of cassava during gari preparation. Int. J. Food Sci. Technol. **25**, 198-203.
- VASSEROT, Y. (1991) Etude de β -glucosidases de levures. Applications à l'hydrolyse des hétérosides terpéniques. Thèse de doctorat. ENSAM. 227 p.
- VIC ROY, T.B., MANDEL, D. K., DEA, D. K., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. (1983) The application of cell recycle to continuous fermentative lactic acid production. Biotechnol. Lett., **5**, 665-670.
- WELKER, N. E., CAMPBELL, L. L. (1967) Comparaison of the α -amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. J. Bacteriol., **94**, 1131-1135.
- WINDHOLZ, M., BUDAVARI, S., BLUMETTI, R. F., OTTERBEIN, E. S. (Eds) (1983) The Merck index · Merck & co, Inc., Rahway N.J., USA. Tenth edition, 1463 p.

- WOOD, T. (1965) The cyanogenic glucoside content of cassava and cassava products. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 300-305.
- WOODWARD, J., WISEMAN, A. (1982) Fungal and other β -D-glucosidases, their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 73-79.
- YEOH, H. H. (1989) Kinetic properties of β -glucosidase from cassava. *Phytochemistry*, **28**, 721-724.
- YEOH, H. H., OH, H. Y. (1979) Cyanide content of cassava. *Malaysian Agric. J.*, **52**, 24-28.
- YEOH, H. H., SIA, H. L. (1987) Characterisation of cassava leaf β -glucosidase. *J. Singapore Nat. Acad. Sci.* **16**, 17-20.

Titre : Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté

Résumé

Afin de maîtriser l'étape de fermentation intervenant dans la majorité des procédés traditionnels de transformations des racines de manioc, les caractéristiques de croissance et de production d'acide lactique d'un certain nombre de bactéries lactiques ont été examinées.

Parmi ces souches, *Lactobacillus plantarum* est apparu rapidement comme la souche la plus appropriée en raison de ses caractéristiques : acido-tolérance, taux de croissance rapide, production de biomasse et d'acide lactique élevées. En vue d'optimiser la production de biomasse de ce microorganisme, sa physiologie, et particulièrement l'influence du pH et du lactate sur sa croissance, ont été étudiées.

Par ailleurs, une souche de *L. plantarum* (A6) possédant une forte activité amyolasique a été isolée à partir d'échantillons de manioc fermenté. Sa physiologie ainsi que les caractéristiques de l' α -amylase excrétée ont été étudiées. Les propriétés particulièrement intéressantes de cette souche pourraient donner lieu à des applications industrielles.

Au cours de cette étude, il a été démontré que les bactéries lactiques résistaient à des concentrations importantes de cyanure et qu'elles étaient capables, pour certaines d'entre elles, de dégrader la linamarine. Il a été noté, en particulier, que la souche *L. plantarum* A6 présentait à la fois une activité linamarase et une activité amyolasique élevées lorsqu'elle était cultivée sur un milieu à base de cellobiose.

Enfin, des essais préliminaires d'inoculation du manioc avec la souche *L. plantarum* A6 ont été réalisés pour la production de gari (aliment traditionnel de l'Afrique de l'Ouest). Les résultats obtenus n'ont montré aucune amélioration notable dans la détoxification du manioc en raison de la présence d'une forte activité linamarase endogène. Par contre, cette souche pourrait jouer un rôle significatif dans le développement des qualités organoleptiques mais aussi dans la conservation et la standardisation du produit obtenu, grâce aux quantités élevées d'acide lactique produit et à la baisse plus rapide et plus importante du pH qui en résulte.

Mots-clés : manioc, bactéries lactiques, *Lactobacillus plantarum*, physiologie, enzymologie, amylase, linamarase, β -glucosidase, cyanure, détoxification, gari, starter.

Résumé