

# Screening des microorganismes à potentialités fermentaires pour le manioc

R. Djouldé Darman<sup>1\*</sup>, F.-X. Etoa<sup>2</sup>, J.-J. Essia Ngang<sup>2</sup>, C.M.F. Mbofung<sup>3</sup>

Keywords: Cassava- Starter culture- Fermentation- Microorganisms- Enzymes

## Résumé

*Les processus de transformation artisanale du manioc pour l'alimentation humaine passe dans la plupart des cas, par une étape de fermentation spontanée non contrôlée. Ceci a pour conséquence une mauvaise qualité des dérivés. Afin d'améliorer ces procédés artisanaux, et par là les qualités nutritionnelle, toxicologique et hygiénique des dérivés du manioc consommés sous les tropiques, une centaine de microorganismes ont été isolés des cossettes de manioc fermenté, ceci dans l'optique d'élaborer un ferment destiné à la fermentation du manioc. Parmi ces souches, 80% produisent des amylases; 66,66% de la linamarase; 26,6% de la pectinéméthylesterase; 3,33% de la pectate lyase et 26,6% de la pectine lyase. La plupart des microorganismes ont indiqué des réelles potentialités à produire les enzymes importantes pour la bioconversion de la pulpe du manioc. Ces microorganismes ont été sélectionnés pour la mise au point d'un ferment de rouissage du manioc.*

## Summary

### Screening for Properties of some Strains of Lactobacilli with Potentials Applications as Starter Culture for Cassava Fermentation

*About hundred strains of microorganisms were isolated, from sun-dried cassava chips and characterised with the scope of identifying strains, which could be further use as starter culture for cassava retting. Of all the isolates, 80% were amylase producers; 66.66%, linamarase producers; 26.6%, pectinmethylesterase; 3.33%, pectate lyase and 26.6%, pectin lyase producers. From all of these strains, 65% were thermobacteria, 35% streptobacteria and 10% of betabacteria. Due to their interesting enzymatic profiles for cassava fermentation, these microorganisms could be identified as appropriate for the development of a starter culture for cassava fermentation.*

## Introduction

Les populations ont su élaborer toute une série de traitements permettant de stabiliser le manioc et ses dérivés, ces derniers étant des denrées hautement périssables (3, 15). Ces traitements visent surtout à stabiliser les produits et à réduire leur toxicité sinon l'éliminer complètement (21). Le problème majeur de l'ensemble de ces procédés traditionnels se situe au niveau de la qualité fluctuante des différents aliments obtenus. En effet, le processus fermentaire qui s'effectue spontanément grâce au développement de la microflore épiphyte, peut conduire à des produits d'une qualité organoleptique, microbiologique ou toxicologique indésirable (22). L'inoculation du manioc avec un starter de micro-organismes se caractérisant par des propriétés physiologiques et métaboliques particulières permettrait d'assurer la maîtrise de l'étape de fermentation. Ces propriétés sont surtout la production des enzymes intervenant au cours de la fermentation du manioc à savoir la  $\beta$ -glucosidase, l' $\alpha$ -amylase et de pectinases. L'objectif de ce travail est: d'isoler, d'identifier et de sélectionner des souches de microorganismes qui répondraient au mieux à

ces différents critères, et de caractériser les enzymes qu'ils produisent, intervenant dans le processus fermentaire naturel du manioc. Ceci pourra conduire à sélectionner les meilleures souches susceptibles d'être utilisées comme ferment pour le rouissage traditionnel du manioc cyanogène.

## Matériel et méthodes

### Préparation du milieu d'isolement

Les isolements sont réalisés à partir des cossettes de manioc séchées, achetées sur le marché local (Ngoundéré-Cameroun). Les cossettes de manioc sont utilisées comme ferments d'accélération de la fermentation de manière traditionnelle du manioc dans certaines régions de l'Afrique (3). Les cossettes de manioc sont des morceaux de racines ayant subi des opérations successives de fermentation de 2 à 3 jours, émottage et défibrage, séchage solaire de 4 à 6 heures. On rencontre les cossettes au Cameroun, en République Centre africaine, en République Démocratique du Congo et en République du Congo. Environ 1 kg de cossettes sont prélevées sur le marché

<sup>1</sup>- Institut de Recherche Agricole pour le Développement, B.P. 33, Maroua, Cameroun. Tél.: (237) 986-17-64, E-mail: djouldedarman@yahoo.fr

\*Auteur à qui toute correspondance devrait être adressée

<sup>2</sup>-Département de Biochimie, Université de Yaoundé, B.P. 1457, Yaoundé, Cameroun. Tél.: (237)966-97-55, E-mail: fxettoa@yahoo.fr, (237)94-30-23, E-mail: essia\_ngang@yahoo.fr

<sup>3</sup>. Department of Food Sciences and Nutrition, National Advanced School of Agro-Process Industries, University of Ngaoundéré, P.O. Box 455, Ngaoundéré, Cameroon. Tél.: (237)984-16-54, E-mail: cmbofung@yahoo.fr

Reçu le 17.03.04. et accepté pour publication le 23.06.04.

de Ngaoundéré (Cameroun) à l'étalage de vente. Un lot de 100 g est introduit dans environ 900 ml d'eau peptonée à 0,1% stérile puis agité vigoureusement jusqu'à dissolution complète des cossettes de manioc dans le liquide de dilution de manière à avoir une solution laiteuse. Cette solution est ensuite placée au bain-marie sous agitation à 30 °C pendant 18 heures, afin de permettre une revivification des micro-organismes.

### Isolement des microorganismes

Un screening primaire est réalisé sur ces échantillons par les méthodes classiques de dénombrement après dilutions décimales (9). Les bactéries lactiques sont isolées sur milieu gélosé MRS par les méthodes décrites par Sharpe *et al.* (23). Les colonies bien isolées sont observées au microscope à l'état frais puis à l'état coloré (au Gram). Un test à la catalase est réalisé. Les levures et moisissures sont isolées sur milieu gélosé Sabouraud et PDA. Les colonies bien isolées subissent une coloration au bleu de méthylène et des observations de la morphologie sont entreprises. La recherche des microorganismes producteurs d'amylases est réalisée sur les souches précédemment isolées, selon les méthodes décrites par Olukoya (18). Les lactobacilles producteurs d'amylases sont sélectionnées par repiquage des colonies présentant des bacilles gram positifs et catalases négatifs, sur milieu MRS additionné d'amidon soluble à 1% et d'actidione à 0,025 g/l comme inhibiteur de champignons. Les levures et moisissures productrices d'amylases sont isolées sur milieu PDA additionné d'amidon soluble à 1% et de chloramphénicol à 0,05 g/l, comme inhibiteur de bactéries. Après incubation, une solution de lugol (0,33% Iode + 12,066% Iodure de potassium) est vaporisée à la surface des boîtes, et les colonies à halo clair au pourtour sont considérées comme productrices d'amylases (18).

La recherche des microorganismes producteurs de linamarase est réalisée par ensemencement des isolats purifiés sur milieu gélosé MRS, Sabouraud et PDA, additionnés de linamarine à 1% et de picrate alcalin à 0,01%, comme capteur de cyanure libéré (15). Les colonies à halo rougeâtre autour sont considérées comme productrices de linamarase.

Le screening des micro-organismes producteurs de pectinases est réalisé selon la procédure de Brisou (5) modifié par Starr *et al.* (23). Les isollements ont été réalisés en utilisant de la gélose MRS sans glucose et extrait de viande pour les lactobacilles ou du PDA sans glucose pour les levures et moisissures, mais en utilisant 14 g/l de pectine (Grindsted RS4006 DM74 le %) et du bleu de bromothymol à 0,05%, comme indicateur coloré.

### Identification des microorganismes

Les souches montrant des réelles caractéristiques à produire les amylases, les pectinases, et linamarase,

sont sélectionnées et repiquées en tubes dans environ 15 à 20 ml bouillon MRS, pour les bactéries lactiques, et sur milieu PDA pour les levures et moisissures. Le profil fermentaire de ces microorganismes, est réalisée à l'aide des galeries API (API 5030 strips Biomerieux France, pour les levures et moisissures, et API 50 CH N° 5030 strip, Biomerieux charbonnière, bains France pour les *Lactobacillaceae*) en vue de leur identification selon le schéma discriminatoire de Hammes *et al.*, (13) et Kandler et Weiss (14).

### Production et caractérisation des enzymes microbiens

*Préparation du matériel végétal:* du manioc de variété TMS 3001 Cyanogène est fraîchement prélevé dans les champs d'expérimentations de l'IRAD (Institut de Recherche Agronomique pour le Développement), centre régional de Ngaoundéré. Les tubercules délicatement déterrés sont introduits dans des sacs en plastique tressés, rapidement transportés au laboratoire, lavés et les tubercules non atteints par les maladies et non blessés sont sélectionnés. Les tubercules sont délicatement pelés puis découpés en cossettes avant d'être stérilisés pendant 15 minutes avec du chlorure de mercure à 1% dans l'éthanol à 70% (17) puis, rincés dans de l'eau distillée stérile. Les tubercules stériles sont ensuite broyés à l'aide d'un broyeur de labo (Robocoupe II) jusqu'à obtention d'une pâte homogène.

*Préparation des inoculum:* des précultures de microorganismes isolés, identifiés et purifiés sont réalisés sur milieu à base d'amidon de manioc de composition suivante: farine de manioc tamisée (10 g),  $K_2HPO_4$  (8,7 g),  $MgSO_4$  (0,1 g),  $NH_4NO_3$  (0,05 g),  $H_2O$  distillée (qsp 1000 ml). La farine est diluée dans 500 ml et stérilisée par filtration, les autres ingrédients sont dilués dans 500 ml d'eau puis stérilisés à 121 °C pendant 15 minutes, refroidis avant d'être mélangés à la farine de manioc diluée stérile. A environ 100 ml de milieu ainsi préparé, on inocule une à deux anses de microorganismes purifiés. L'ensemble est incubé 30 °C pendant 18 à 24 heures pour les lactobacillus, et à 25 °C pendant 24 à 48 heures pour les levures et les moisissures

NB: La farine de manioc tamisée est préparée à partir des tubercules frais découpés en cossettes séchées à l'étuve à 105 °C pendant 24 à 48 heures, puis broyées et tamisées à l'aide d'un tamis de mailles de 10 µm.

### Ensemencement et conduite de la fermentation

100 ml de précultures précédemment réalisées sont malaxées avec 250 g de pâtes de manioc stériles préparés un peu plus haut dilués dans 500 ml d'eau distillée stérile. L'ensemble est introduit dans un fermenteur de labo de 2 litres de marque Multigen (Biolafite). Les températures des échantillons inoculés par les bactéries lactiques sont réglées à 32 °C sous une agitation lente de 50 rpm, la pression d'oxygène

est régulée à 7 pg/mn, alors que les températures des échantillons inoculés par les levures sont réglées à 30 °C sans agitation. Le pH est régulé, par addition de NaOH 5 N ou de HCL 0,1 N selon le cas. Les échantillons inoculés par les moisissures sont incubés à 30 °C avec de temps en temps un malaxage mécanique. Toutes les fermentations sont conduites pendant 96 heures.

### Extraction partielle et dosage des enzymes

*Préparation du matériel d'analyse:* 100 ml de substrat en fermentation sont prélevés toutes les 12 heures. L'extraction partielle des enzymes est réalisée, selon le protocole décrit par Ampe et Brauman (1) en centrifugeant le substrat à 20000 rpm pendant 30 mn. Le surnageant de centrifugation est recueilli dans 80 ml de tampon citrate environ (pour 100 ml de surnageant) et conservé à 4 °C pour les extractions.

La linamarase est extraite par la méthode de Giraud *et al.*, (11): 100 ml de surnageant sont mélangés à 300 ml de solution tampon d'acétate à 0,1 M. Le mélange est ajusté à pH 5,5 puis filtré à travers un filtre de Kieselghur. Le filtrat ainsi obtenu est soumis à deux autres filtrations sous vide. Le dernier filtrat d'aspect limpide est conservé à 4 °C pendant 16 heures puis, dilué dans deux volumes d'acétone à 0 °C. Le mélange est constamment agité pendant 2 heures. Le précipité vert pâle qui apparaît est repris dans 10 ml de solution tampon d'acétate 0,1 M puis à nouveau dilué dans 2,3 volumes d'acétone à 0 °C. Le précipité de linamarase résiduel formé est conservé à 2 °C pour dosage.

Le dosage est effectué en diluant 400 µl d'extrait dans 100 µl de linamarine à 50 mM dans du tampon citrate 0,1 M (pH 6). A intervalles de temps réguliers (1 minute), 50 µl de NaOH 0,1 M sont ajoutés pour stopper la réaction. Le cyanure libéré par addition de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 850 µl d'eau distillée à chacun des aliquots, est dosé par addition de 10 ml de picrate alcalin à 1 ml de linamarine diluée dans le surnageant. L'absorbance est alors déterminée à 400 nm au spectrophotomètre (Beckman modèle 25). L'unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme (extrait) libérant 1 µmol de CN<sup>-</sup> par minute.

Les pectinases sont extraites par la méthode de Ampe *et al.*, (2) et de Brauman *et al.* (4): 80 ml de solution tampon citrate 0,1 M pH 6,5 sont ajoutés à 100 ml de surnageant. L'activité pectinesterase (PE; pectine pectylhydrolase, EC 3.1.1.11), est mesurée par titration de 1 ml d'extrait dans la pectine à 1% à 30 °C, par du NaOH 0,01 M. L'unité enzymatique correspond à la neutralisation de 1 µmol de COO<sup>-</sup>/minutes.

L'activité polygalacturonate lyase (PGL) est mesurée par la méthode de Starr *et al.*, (24). Une unité de PGL correspond à la formation de 1 µmol d'une liaison insaturée dans le galacturonide entre les carbones C4 et C5. La polygalacturonase (PG; poly (1,4- $\alpha$ -D-galacturonide) glycanohydrolase, EC 3.2.1.15), est évaluée par viscosimétrie. A 40 ml de pectine à 1% dans 100 mM de tampon acétate (pH 4,7), 0,5 ml

d'extrait est additionné. La réduction de la viscosité est alors mesurée à 25 °C. L'unité enzymatique correspond à la libération d'1 µmol d'hexose/minute. L'activité amylasique est dosée par la méthode de Ampe *et al.*, (2) par ajout de 0,1 ml d'extrait à 0,8 ml d'une solution contenant 1% d'amidon soluble dans un tampon citrate phosphate 0,1 M pH 6,9. La réaction est stoppée par addition de 0,1 ml d'acide sulfurique à 2 N l'amidon résiduel est dosé à différents temps d'incubation à 30 °C par ajout de 0,1 ml de l'échantillon convenablement dilué à 2,4 ml de réactif iodo-ioduré. La densité optique est lue à 620 nm. L'unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire à l'hydrolyse de 10 g d'amidon en 30 mn à 30 °C.

### Dosage des sucres résiduels et suivi de la microflore

La linamarine résiduelle est déterminée par la méthode de Sylvestre et Arreaudeau (26): 100 ml de surnageant de centrifugation sont placés dans un Kjeldahl de 250 ml, puis ajustés par 50 ml d'eau. L'ensemble est laissé à température ambiante pendant 4 heures au terme desquelles une filtration est réalisée sur du papier watman n° 5. Le filtrat (environ 150 à 160 ml) est recueilli dans une solution de soude à 2,5%. A 25 ml de distillat, 2 ml de solution de NH<sub>4</sub>OH 6 N et 2 ml de solution d'iodure de potassium à 5% sont ajoutées. L'ensemble est titré à l'aide du nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub>) 0,02 N jusqu'à virage. La quantité de linamarine résiduelle est exprimée en ppm.

L'amidon résiduel est dosé sur 0,1 ml de surnageant de centrifugation dont le pH est ramené à pH 6,9 par un tampon citrate phosphate 0,1 M. Après quelques minutes d'incubation à 30 °C, la densité optique de 0,1 ml de l'échantillon convenablement dilué à 2,4 ml de réactif iodo-ioduré est lue au spectrophotomètre à 620 nm.

Le suivi de la croissance microbienne est effectué par comptage direct au microscope sur hématimètre, et dénombrement sur milieu sélectif solide.

## Résultats

### Les bactéries lactiques des cossettes de manioc

Une centaine de souches de bactéries lactiques ont été isolées des cossettes de manioc parmi lesquelles 65% de *Thermobacterium*, 35% de *Streptobacterium* et 10% de *Betabacterium*. L'identification des souches selon les codifications du "Bergey's manual", du manuel d'identification API 50CH N° 5030 (Strip, Biomerieux Charbonnière, Bains France), et suivant la classification taxonomique de Hammes *et al.* (13) et, Kandler et Wiess (14), nous a permis d'avoir des souches dont les caractéristiques sont présentées dans les tableaux 1, 2 et 3. On notera part ailleurs (Tableau 2) que les souches de *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coprophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus*

**Tableau 1**  
**Quelques caractéristiques des souches non identifiées**

Milieu d'isolement	MRS (Man Rogosa Sharp)	PCA (Plate count-agar)		
Morphologie		Bacilles Gram positifs		
Mobilité		Immobilés		
Catalase	-	-	-	
Acide lactique	L(+)	DL	DL	
Croissance à 15 °C	-	-	+	
Croissance à 25 °C	±	+	+	
Croissance à 45 °C	+	+	-	
Enzymes	$\alpha$ -amylase	+	+	-
	$\beta$ -glucosidase	-	+	+
	Pectine méthylesterase	+	+	-
	Pectate lyase	+	-	+
	Pectin lyase	+	+	+
Sucres (fermentation)	Esculine	+	+	+
	Amygdaline	+	+	+
	Arabinose	-	+	-
	Cellobiose	+	+	+
	Galactose	-	+	+
	Glucose	+	+	+
	Lactose	+	+	+
	Maltose	+	-	-
	Mannitol	-	-	-
	Saccharose	+	+	-
	Tréhalose	-	+	+
	Raffinose	+	+	-
	Rhamnose	+	-	-
	Ribose	-	+	+
Xylose	+	-	+	
Orientation	<i>Lactobacillus</i> sp.1	<i>Lactobacillus</i> sp. 2	<i>Lactobacillus</i> sp. 3	

*acidophilus* sont producteurs d' $\alpha$ -amylase soit un total d'environ 60% de souches des lactobacillus isolées des cossettes. La meilleure souche au vu des diamètres des auréoles est *Lactobacillus plantarum* avec  $5 \pm 2$  cm de diamètre. La production qualitative de la  $\beta$ -glucosidase indique globalement qu'environ 46,66% des souches de bactéries lactiques isolées sont de susceptibles productrices de cette enzyme. Concernant les pectinases, environ 53,33% des souches de Lactobacillus sont susceptibles de produire la pectinesterase (PE; pectine pectylhydrolase, EC 3.1.1.11), la polygalacturonate lyase (PGL) et la polygalacturonase (PG; poly (1,4- $\alpha$ -d-galacturonide) glycanohydrolase, EC 3.2.1.15). Parmi ces souches nous noterons la présence de trois qui n'ont put être identifiées, n'ayant pas de profils, comparables par les méthodes classiques de codification décrites dans le "Bergey's manual", le manuel d'identification API 50CH N° 5030 (Strip, biomerieux charbonnière, bains France), et suivant la classification taxonomique de Hammes *et al.* (13) et, Kandler et Wiess (14) (Tableau 1).

#### Les levures et moisissures des cossettes de manioc

Parmi les microorganismes isolés, une vingtaine appartient au groupe des levures et moisissures. Les identifications menées à l'aide des galeries API 20 C (API system S.A. La Balme les grottes 38390 Montalieu vercieu France), nous ont permis de noter que les levures de genres *Saccharomyces* et *Candida* sont prédominantes. On notera ainsi la présence des espèces intéressantes comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida krusei*,

**Tableau 2**  
**Production qualitative des enzymes par les lactobacillus isolés**

Microorganismes	Enzymes				
	$\alpha$ -amylases	$\beta$ -glucosidase	Pectine méthylesterase	Pectate lyase	Pectine lyase
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	+	++	++	±	+
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>pseudo tropicalis</i>	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i>	±	+	-	-	±
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	-	-	-	-	±
<i>Lactobacillus coprophilus</i>	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	+	±	-	+
<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	++	-	+	++
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	+	+	+	±	+
<i>Lactobacillus gasseri</i>	-	-	+	-	-
<i>Lactobacillus delbruekii</i>	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	-	±	+	+
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	-	-	+	-	±

++: Forte activité (diamètre auréole supérieure à 10 mm).

+: Activité moyenne (diamètre auréole comprise entre 5-10 mm).

±: Activité intermédiaire (diamètre auréole comprise entre 1-5 mm).

-: Activité nulle (pas d'auréole).

**Tableau 3**  
**Production qualitative des enzymes par les levures et moisissures isolées**

Microorganismes	Enzymes				
	$\alpha$ -amylases	$\beta$ -glucosidase	Pectine méthylesterase	Pectate lyase	Pectine lyase
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	+	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	++	±	+	+	+
<i>Candida pseudotropicalis</i>	±	-	-	+	-
<i>Candida krusei</i>	+	-	-	+	±
<i>Geotrichum candidum</i>	+	-	-	-	+
<i>Rhizopus nigrica</i>	+	-	-	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	++	±	++	+	+
<i>Aspergillus flavus</i> Link	-	-	-	+	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	-	+	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	+	-	+
<i>Aspergillus flavipes</i>	-	-	-	+	±
<i>Aspergillus sparsus</i>	-	-	±	±	-

++ : Forte activité (diamètre auréole supérieure à 10 mm).

+ : Activité moyenne (diamètre auréole comprise entre 5-10 mm).

± : Activité intermédiaire (diamètre auréole comprise entre 1-5 mm).

- : Activité nulle (pas d'auréole).

*Geotrichum candidum*. 66,66% des levures sont productrices d'amylases, 16,66% productrices de linamarase, et 52,77% productrices de pectinases. Les espèces *Rhizopus nigrica*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavipes* et *Aspergillus sparsus*, ont été isolées et identifiées. 35% sont productrices d'amylases, 25% produisent la linamarase et 75% produisent des pectinases (Tableau 3).

#### Activité enzymatique des souches sélectionnées

**Les amylases:** l'activité amylolytique observée au cours de ces expériences, indique globalement une meilleure activité chez les espèces *Lactobacillus* que chez les levures et les moisissures (Figure 2). Les cinétiques de production étant globalement similaires aux cinétiques classiques avec une phase de latence, une phase d'accélération, dont les durées varient selon les germes, une phase exponentielle avec accélération constante, et des légères phases stationnaires, la phase de mortalité est ici inapparente. On remarquera cependant que l'espèce *Rhizopus oryzae* donne les meilleurs résultats avec plus de  $10.000 \pm 1000$  UE/l après 12 heures de fermentation. Toutes les autres souches des champignons n'atteignent pas ce résultat même après 96 heures de fermentation, temps au bout duquel on a chez la même souche, près de  $20000 \pm 500$  UE/l. On observe, que les bactéries lactiques ont des taux variants de 5000 UE/l à 18000 UE/l. A cet égard on observera pour les souches de *Lactobacillus plantarum*, Lb<sub>2</sub>, et Lb<sub>1</sub> une meilleure production d' $\alpha$ -amylase (Figure 1A). Les phases de latence varient de 12 heures chez Lb<sub>2</sub> à 48 heures chez Lb<sub>1</sub> alors que *Lactobacillus plantarum*

indique une phase d'adaptation de 24 heures. Cette durée de la phase d'adaptation est précurseur d'une phase d'accélération et d'une phase exponentielle dynamiques, qui par après présente les meilleurs taux de production (près de  $17000 \pm 500$  UE/l), qui supplante largement les autres (Figure 2A) dont les optimums d'activités se limitent à  $1500 \pm 230$  UE/l. La souche de *Lactobacillus plantarum*, dégrade jusqu'à 75% d'amidon en 72 heures de fermentation. Chez les levures et moisissures, seule la souche de *Rhizopus oryzae* présente une activité assez appréciable avec

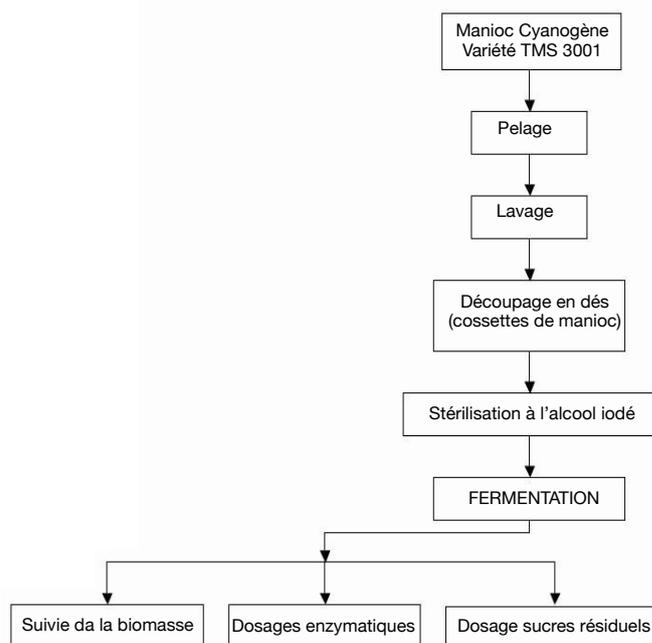


Figure 1: Flow sheet du procédé d'évaluation de la production des enzymes.

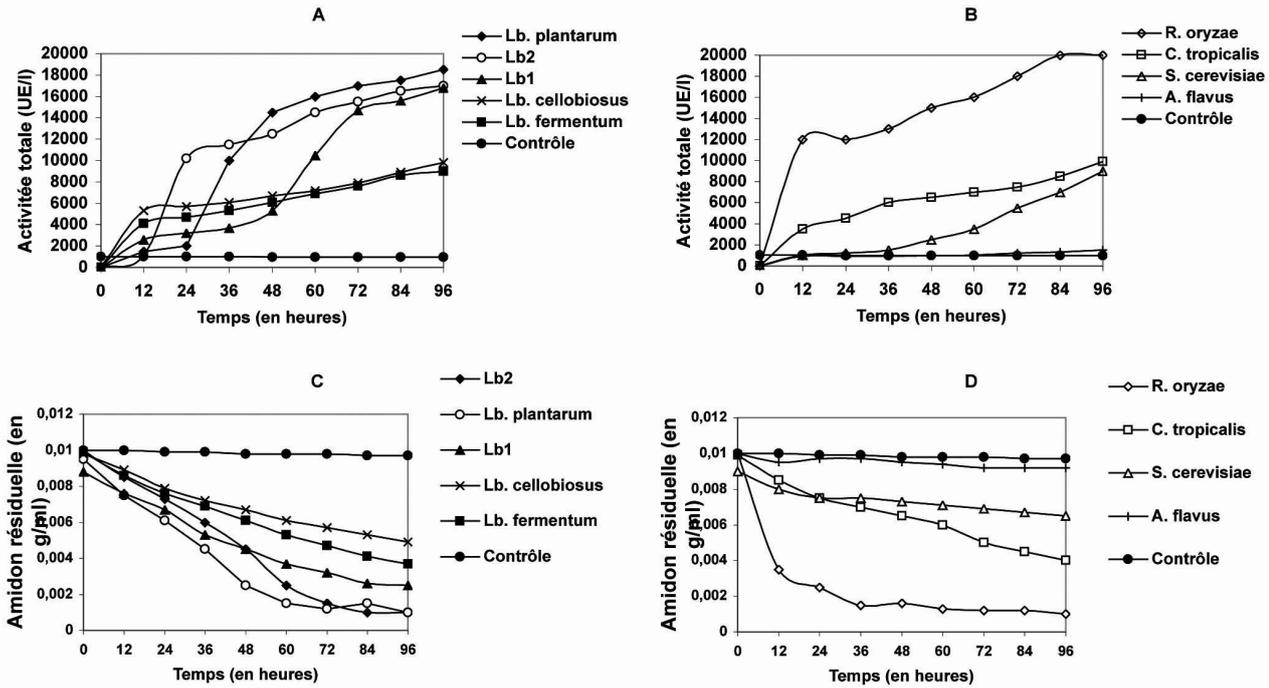


Figure 2: Activité amylolytique (A et B) et dégradation de l'amidon de manioc (C et D) au cours du temps par les souches sélectionnées.

près de 12000 UE/l après 12 heures de culture seulement (Figure 1B) et près de 20000 UE/l dès la 84<sup>ème</sup> heure. On observe par ailleurs les meilleurs taux de dégradation avec *Rhizopus oryzae*, avec une digestion presque complète après 36 heures de fermentation et un taux résiduel d'amidon de l'ordre de  $1,5 \pm 0,08$  mg/ml (Figure 3). On notera par ailleurs que l'espèce *Rhizopus oryzae* en 12 heures de temps métabolise environ 70% d'amidon et en 24 heures près de 85%, alors que les lactobacillus ont des activités globalement plus lentes et moins denses

mais avec des taux de dégradations non négligeables (Figure 2D). Il existe globalement une corrélation positive ( $R^2= 6,5$ ) entre l'augmentation de l'activité enzymatique et la dégradation de l'amidon (Figures 2 ABCD) ce qui laisse suggérer un effet de l' $\alpha$ -amylase produite par les microorganismes sur la dégradation de l'amidon. Les cinétiques de production d' $\alpha$ -amylase, et de dégradation de l'amidon de manioc varient cependant selon les souches ( $p < 0,05$ ), on ne note pas de cinétiques type (Figure 2).

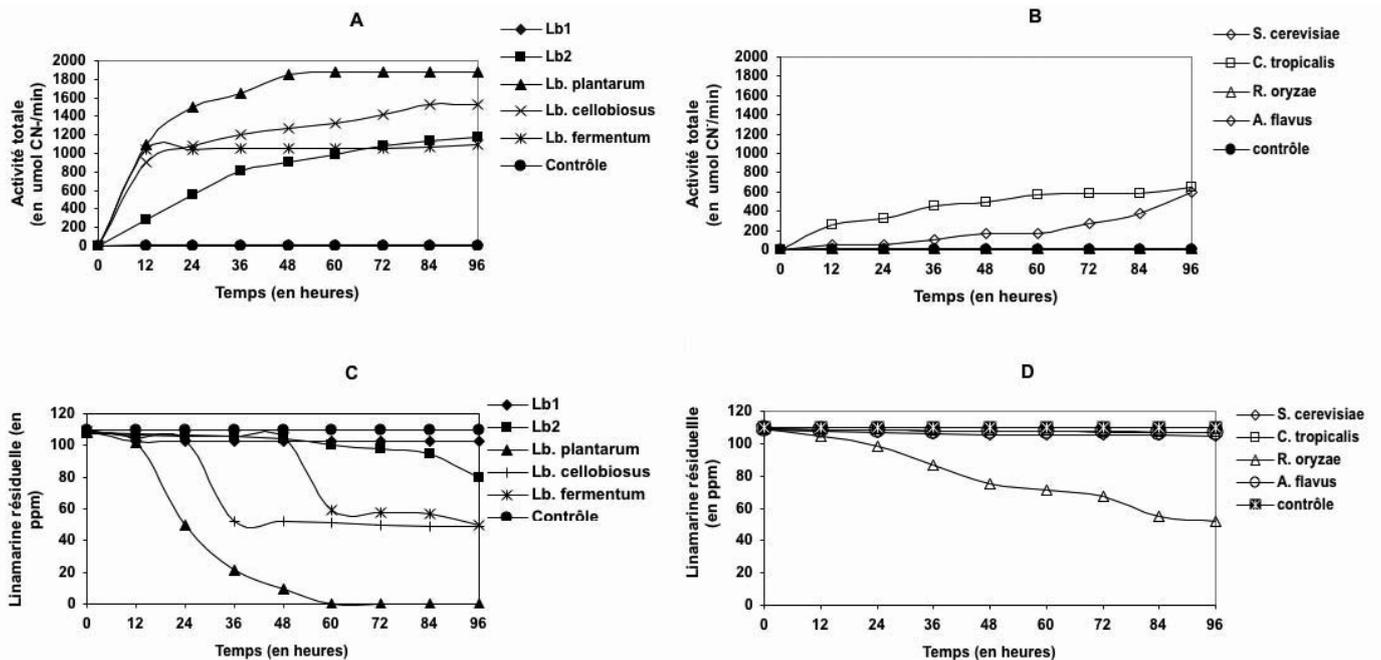


Figure 3: Production de linamarase et dégradation de la linamarine purifiée par les souches sélectionnées au cours du temps.

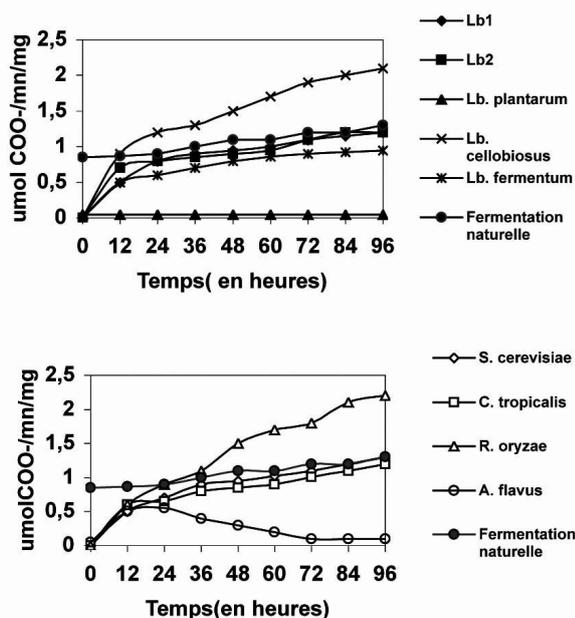


Figure 4: Production de la pectine méthylesterase par les souches sélectionnées au cours du temps.

*La  $\beta$ -glucosidase:* La production de la  $\beta$ -glucosidase, globalement ne suit pas comme pour l' $\alpha$ -amylase une cinétique classique de production de métabolite. Il n'existe pas de phase d'adaptation (Figures 4A et 4B) et la phase de mortalité n'apparaît pas clairement. La production si elle a lieu débute brusquement dès la première heure de fermentation, on a l'impression qu'elle est indépendante aussi bien du substrat utilisé que de la croissance microbienne car il n'existe pas de corrélation entre l'évolution de la biomasse et la production de cet enzyme. La souche de *Lactobacillus plantarum* semble être la meilleure, point de vue production de  $\beta$ -glucosidase, parmi tous les microorganismes isolés avec une activité de  $1200 \pm 100 \mu\text{mol}$  de  $\text{CN}^-/\text{minutes}$ , déjà après 12 heures de fermentation on a un total de  $864000 \pm 200 \mu\text{mol}$  de  $\text{CN}^-$  libérés. Après 48 heures on a une vitesse de libération de l'ordre de  $2000 \pm 300 \mu\text{mol}$  de  $\text{CN}^-/\text{minutes}$ . Après *Lactobacillus plantarum* on a la souche de *Lactobacillus cellobiosus* dont les vitesses de libération de  $\text{CN}^-$  des tubercules de manioc vont de  $1000 \pm 100 \mu\text{mol}$  de  $\text{CN}^-/\text{minutes}$  à  $1400 \pm 100 \mu\text{mol}$  de  $\text{CN}^-/\text{minutes}$ . L'activité  $\beta$ -glucosidase est globalement moins importante chez les levures et moisissures que chez les lactobacilles (Figures 4A et 4B). On note néanmoins une corrélation positive ( $R^2 = 3,1$ ) entre l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et la dégradation du glucoside (Linamarine) avec des taux de réduction variant globalement de 40 à 80% après 96 heures de fermentation.

La production des pectinases indique globalement une activité similaire aussi bien chez les bactéries lactiques que chez les levures et moisissures (Figure 4). On note une activité un peu plus accentuée chez

*Lactobacillus cellobiosus* et *Rhizopus oryzae* avec respectivement  $1,7 \pm 0,7$  UE et  $1,3 \pm 0,5$  UE, alors que le manioc en cours de fermentation développerait une activité de 0,9 UE pendant le même temps de fermentation (2).

## Discussion

Il a été démontré au cours des études ultérieures que les microorganismes jouent un rôle important et même primordial dans les processus de fermentation du manioc cyanogène (8, 9). Vu le profil assez intéressant des lactobacilles en général, il est capital que parmi les souches devant faire partie d'un éventuel ferment pour la fermentation du manioc, on puisse avoir au moins un lactobacille. Nous devons particulièrement noter le profil assez bon de la souche de *Lactobacillus plantarum*, comme ferment potentiel. En effet, en nous référant aux résultats obtenus ci-dessus, elle est la meilleure souche productrice de deux enzymes au moins ( $\alpha$ -amylase et  $\beta$ -glucosidase), de plus elle possède aussi une activité pectinase. La souche de *Rhizopus oryzae*, peut aussi être choisie car en plus de son potentiel enzymatique dont les principaux recherchés ( $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -glucosidase, et activité pectinase), cette souche a un potentiel énorme pour l'enrichissement protéique du manioc. En effet, elle donnerait une biomasse importante sur l'amidon de manioc et ce mycélium sont une source de protéines et de vitamine B (25). Ces deux souches pourraient donc être particulièrement intéressantes pour la mise au point d'un ferment de détoxication et d'enrichissement protéique du manioc cyanogène. La production qualitative de la  $\beta$ -glucosidase indique globalement qu'environ 46,66% des souches isolées sont susceptibles de participer à la détoxication du manioc en dégradant la linamarine. Il est à noter que la  $\beta$ -glucosidase est l'enzyme principale responsable de la dégradation naturelle des glucosides cyanogénétiques du manioc (6). Les microorganismes producteurs de la linamarase isolés ici pourraient jouer un rôle dans les processus de détoxication du manioc aux côtés de la linamarase endogène. Ejiofor et Okafor (10), Okafor (16), indiquent d'ailleurs le rôle capital des microorganismes dans l'achèvement des processus de dégradation des composés cyanés. Westby et Twiddy (27) utilisant des souches de *Saccharomyces cerevisiae* comme levain, ont indiqués des résultats significatifs en abaissant considérablement le taux de glucosides cyanogénétiques et de résidus cyanés dans la farine de céréales notamment la farine de sorgho (11). Oyewole et Odunfa (19, 20) ont révélé que certaines souches de moisissures entrant dans la fermentation du manioc et plus précisément *Aspergillus sydowi* et *Fusarium esquiseti* produisent la linamarase responsable de l'hydrolyse des glucosides cyanogénétiques.

Concernant la production des cellulases, environ 53,33% des souches isolées sont susceptibles

d'attaquer les structures du squelette de la paroi cellulaire (pectine) des tubercules de manioc et de contribuer ainsi à ramollir rapidement les tubercules au cours du rouissage. Ceci aurait comme conséquence la libération de la linamarine endogène. Yandju (28) indique à cet effet que les champignons détectés en fin de fermentation du manioc, seraient responsables de ce ramollissement en produisant des cellulases. Parmi les souches isolées, comme nous l'avons indiqués, trois n'ont pu être identifiées, car n'ayant pas de profils, comparables par les méthodes classiques de codification décrits dans le "Bergey's manual", le manuel d'identification API 50CH N° 5030 (Strip, biomerieux charbonnière, bains France), et suivant la classification taxonomique de Hammes *et al.* (13) et, Kandler et Wiess (14). Nous avons exclu

l'hypothèse d'une mauvaise manipulation en répétant l'identification (Tableau 1). Nous pensons que ces souches pourraient être le résultat de mutations ou alors ce seraient tout simplement de nouvelles souches encore non identifiées.

## Conclusion

La mise au point d'un starter pour fermentation du manioc que nous envisageons pour la suite de ce travail à partir des souches isolées, sera d'une grande importance pour le monde rural, notamment dans le cas de la production des dérivés du manioc le plus couramment consommés (cossettes, gari, tapioca...) où l'on recherche principalement une détoxification et une acidification importante associée à une production élevée d'acide lactique.

## Références bibliographiques

- Ampe F. & Brauman A., 1995, Enzymatic origin of detoxification and root softening in cassava. *World J. of Microbiol. Biotechnology*, 23, 345-402.
- Ampe F., Kéléké S., Robert H. & Brauman A., 1995, The role and origin of pectin degrading enzymes during cassava retting. *In: Agbor E., Brauman A., Griffon D., Trèche S. éd.: Transformation alimentaire du manioc. Orstom. Paris. pp 331-344.*
- Bokanga M., 2001, Cassava: Post-harvest opérations, 220 p éd. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria.
- Brauman A., Kéléké S., Mavoungou O., Ampe F. & Miambi E., 1995, Etude d'une fermentation lactique traditionnelle des racines de manioc en Afrique Centrale (Congo). *In: Agbor E., Brauman A., Griffon D., Trèche S. éd.: Transformation alimentaire du manioc. Orstom. Paris.*
- Brisou J., 1971, Techniques d'enzymologie bactérienne, (Eds Masson et C<sup>ie</sup>) 290 pages.
- Buttiaux R., Beerens H., Taquet A., 1974, Manuel de techniques bactériologiques, 4<sup>ème</sup> ed. Flammarion, Paris, 70 p.
- Collar P. & Lévy S., 1959, A two stage fermentation of cassava. *Nature*, 183, 620-621.
- Djouldé D.R., 1998, Effet de la fermentation sur les composés cyanogénétiques du manioc, Mémoire de maîtrise de Biologie Appliquée, Faculté des Sciences Université de Ngaoundéré, 62 pages.
- Djouldé D.R., Essia Ngang J.J & Etoa F-X., 2000, Amélioration du rouissage du manioc cyanogène, *Biosciences Proceeding*, vol 7 pp. 126-134.
- Ejiofor M.A.N. & Okafor N., 1981, Comparison of pressed and unpressed cassava pulp for gari making; tropical root crop: research strategies for the 1980. Terry E.R., Odoro K.A., Caveness eds FDRC, in Ottawa, Canada, 54-159.
- Esser A.J.A. & Nout M.J.R., 1989, The safety of dark, moulded cassava flour compared with white - A comparison of traditionally dried cassava pieces in north east Mozambique. *Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria*, p. 7-10.
- Giraud E., Brauman A., Kéléké S., Gosselin L. & Raimbault M., 1995, Contrôle de la fermentation du manioc pour un meilleur gari: utilisation d'un starter de *Lactobacillus plantarum* à activité linamarase et amylase. *In: Transformation alimentaire du manioc. Ed Agbor E., Brauman A., Griffon D., Trèche S., Orstom. Paris.*
- Hammes W.P., Weiss N. & Holzapfel W., 1992, The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *In: Prokaryotes* (Eds B.Albert, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, H.K. Schleifer. 2<sup>nd</sup> Eds., Vol 2 New York Inc. Springer- Verlag.
- Kandler O. & Wiess N., 1986, Regular, non-sporing gram-positive rods. *In: Sneath P.H.A., Mair N., Sharpe M.E., Holt J.G., éd.: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2. Baltimore. Williams and Wilkins, 1208-1234.*
- Nambissam S., 1985, Effect of processing on the cyanoglucosides content of cassava. *Journal of Science of food and Agriculture* 36, 1199-1203, Bokanga 2001.
- Okafor N., 1977, Microorganisms associated with cassava fermentation for "gari" production. *Journal of Applied Bacteriology*, 42, 279-284.
- Okafor N., Ijioma B. & Oyolu C., 1984, Studies on the microbiology of cassava retting for foo-foo production, *Journal of Applied Bacteriology*, 42, 279-284.
- Olukoya D.K., 1995, Screening of local isolate of *Lactobacillus* for characters useful in African food fermentations. *In: Transformation alimentaire du manioc. Eds T. Agbor Egbe, A. Brauman, D. Griffon. and S. Trèche, 1995, Editions ORSTOM: 345-352.*
- Oyewole O.B. & Odufa S.A., 1988, Microbiological studies on cassava fermentation for «Lafun» production food microbiology, 5, 125-133.
- Oyewole O.B., 1992, Cassava processing in Africa. *In: Application of biotechnology to traditional fermented foods. Report of an ad-hoc panel of the board on science and technology for international development, USA, National Research Council, 89-92.*
- Oyewole O.B., 1995, Application of biotechnology to cassava processing in Africa. *In: Transformation alimentaire du manioc* (Eds T. Agbor Egbe, A. Brauman, D. Griffon and S. Trèche), pp. 277-286 Paris, ORSTOM.
- Rainbault, 1995, Bactéries lactiques et fermentation du manioc. *In: Transformation alimentaire du manioc.* (Eds T. Agbor Egbe, A. Brauman, D. Griffon and S. Trèche.) pp. 258-275, Paris, ORSTOM.
- Sharp M.E., Fryer T.F. & Smith D.G., 1966, Identification of the lactic acid bacteria. *In: Identification methods for microbiologists, Part A*, (Eds B.M Gibbs & F.A. Skinner, London & New York: Academic Press.
- Starr M.P., Chatterjee A.K., Starr P.B. & Buchanan G.E., 1977, Enzymatic degradation of polygalacturonic acid by *Yersinia* and *Klebsiella* species in relation to clinical laboratory procedures. *J. Clin. Microbiol.* 6, 379-386.
- Svanberg U. & Svanberg A., 1989, Improved iron availability in weaning foods using germination and fermentation. *In: Nutrient availability: Chemical and biological aspects.* Ed. Southgate D., Johnson D., Fenwick G., Royal society of Chem., Special Pub. N° 72: 179-181.
- Sylvestre M. & Arreaudeau T., 1983, Le manioc, 159 p. Editions ORSTOM.
- Westby A. & Twiddy D., 1992, Role of micro-organisms in the reduction of cyanide during traditional processing of African cassava products. *In: IFS Proceed. Workshop Trad. African Foods, Quality and Nutrition*, 25-29 Nov. 1991, Ed. Westby et Reilly, 127- 131.
- Yandju D.L., 1989, L'importance des moisissures dans le ramollissement du manioc en fermentation sèche. Mémoire de D.E.S., Fac.Sc. UNIKIS, Kisangani, Zaïre.

R. Djouldé Darman, Camerounais, Institut de Recherche Agricole pour le Développement, B.P. 33, Maroua, Cameroun.

F.-X. Etoa, Camerounais, Département de Biochimie, Université de Yaoundé, B.P.1457, Yaoundé, Cameroun.

J.-J. Essia Ngang, Camerounais, Microbiologiste, Chargé de cours des universités camerounaises, Responsable de laboratoire de microbiologie appliquée, Université de Yaoundé I, B.P. 812, Yaoundé, Cameroun.

C.M.F. Mbofung, Camerounais, Department of Food Sciences and Nutrition, National Advanced School of Agro-Process Industries, University de Ngaoundéré, P.O. Box 455, Ngaoundéré, Cameroun.