

Propriétés antifongiques de la microflore sporulée du *nététu*

Babacar N'Dir, Choukri Hbid, Colette Cornélius, Dominique Roblain, Philippe Jacques, Fabien Vanhentenryck, Mouhamadou Diop, Philippe Thonart

Les condiments traditionnels africains, obtenus par fermentation de graines de soja, de graines oléagineuses de ricin, de pépins de melon et de graines de caroube africaine occupent une part importante dans l'alimentation africaine. Leur haute valeur nutritive ainsi que leurs propriétés organoleptiques en font des condiments largement utilisés dans la préparation de sauces, de ragoûts, de poissons farcis...

Les graines de caroube africaine (*Parkia biglobosa*) (photo 1) sont consommées dans nombre de pays africains sous forme d'un condiment végétal fermenté appelé *dawa-dawa* ou *iru* au Nigeria, *soumbala* au Mali et *nététu* au Sénégal. Ce produit aromatique est très utilisé dans la cuisine traditionnelle malgré la concurrence d'arômes et d'exhausteurs de goût étrangers fabriqués industriellement. Sa fabrication demande beaucoup de temps et d'énergie.

En Afrique, où la chaîne du froid est

quasi inexistante, la fermentation de produits alimentaires reste une technique traditionnelle, très facile à mettre en œuvre, permettant la transformation et, surtout, la conservation des produits.

Une fermentation contrôlée des produits alimentaires nécessite toutefois la maîtrise de la microbiologie et la mise au point de *starters*. Un *starter* sélectionné doit reproduire, dans des conditions contrôlées, un produit sain ayant toutes les caractéristiques organoleptiques du produit fermenté traditionnel. Le développement et la valorisation du *nététu* par voie biotechnologique représentent une possibilité intéressante du point de vue économique. La richesse du *nététu* en protéines et en lipides en fait un condiment de choix parfois utilisé par les familles pauvres comme substitut de la viande [1].

Des études microbiologiques récentes du *dawa-dawa* ou *iru* au Nigeria ont montré que la microflore dominante impliquée dans la fermentation des graines de caroube africaine est constituée de germes sporulés du genre *Bacillus* [2-5]. Aucun travail n'a jusqu'à présent déterminé si ces microorganismes étaient également responsables, par la production de substances antifongiques (entre autres) de type « lipopeptidique » [6-14], de la conservation remarquable de cet aliment.

Ces lipopeptides, dont la majorité appartient au groupe des Iturines, sont

des molécules cycliques renfermant des acides α -aminés de configuration L ou D et un acide gras β -aminé dont la chaîne possède de 14 à 17 atomes de carbone. Ils sont caractéristiques du genre *Bacillus* et possèdent une activité antibactérienne réduite et une intense activité antifongique [7-14]. Le groupe des Iturines comprend l'Iturine A, D et E, la Bacillomycine D, F et L et la Mycosubtiline. La Surfactine possède, quant à elle, un acide gras β -hydroxylé. Son activité antifongique est plus faible mais c'est l'un des meilleurs biosurfactants connus produit par diverses souches de *B. subtilis* [6]. Tous ces lipopeptides ont des propriétés hémolytiques marquées qui réduisent fortement leur potentialité d'utilisation en thérapeutique humaine.

Le présent travail a pour but la caractérisation de la microflore sporulée du *nététu*, notamment en ce qui concerne ses propriétés antifongiques. Ceci pourrait conduire à des conclusions utiles concernant l'importance de différentes souches de *Bacillus* pour la fermentation et l'innocuité du produit fermenté.

Production artisanale du *nététu*

La fabrication traditionnelle du *nététu* nécessite beaucoup de temps et d'énergie.

B. N'Dir, F. Vanhentenryck, M. Diop : Institut de technologie alimentaire, BP 2765 Dakar, Sénégal.

C. Hbid, C. Cornélius, P. Jacques, P. Thonart : Centre wallon de biologie industrielle, service de technologie microbienne, ULg, B40, 4000 Liège, Belgique.

D. Roblain, P. Thonart : Centre wallon de biologie industrielle, unité de Bio-Industries, FSAGx, 5030 Gembloux, Belgique.

Elle varie suivant les pays et les ethnies mais présente trois étapes essentielles (figure 1) : une première cuisson des graines séchées au soleil, une deuxième cuisson après décortiquage et lavage, enfin, une fermentation des cotylédons cuits.

Première cuisson : les graines crues sont mises à cuire dans de l'eau courante au feu de bois pendant 15 à 24 h. La première cuisson entraîne la perte d'astringence ou d'amertume des graines et, surtout, le ramollissement du tégument séminal, facilitant ainsi le décortiquage.

Deuxième cuisson : les graines cuites sont décortiquées au mortier traditionnel ; ceci permet une séparation des cotylédons et un léger broyage. Ensuite, les cotylédons décortiqués sont lavés à grande eau et remis à cuire pendant 30 min à 2 h suivant les régions. La deuxième cuisson serait une sorte de blanchiment contribuant à minimiser les contaminations secondaires

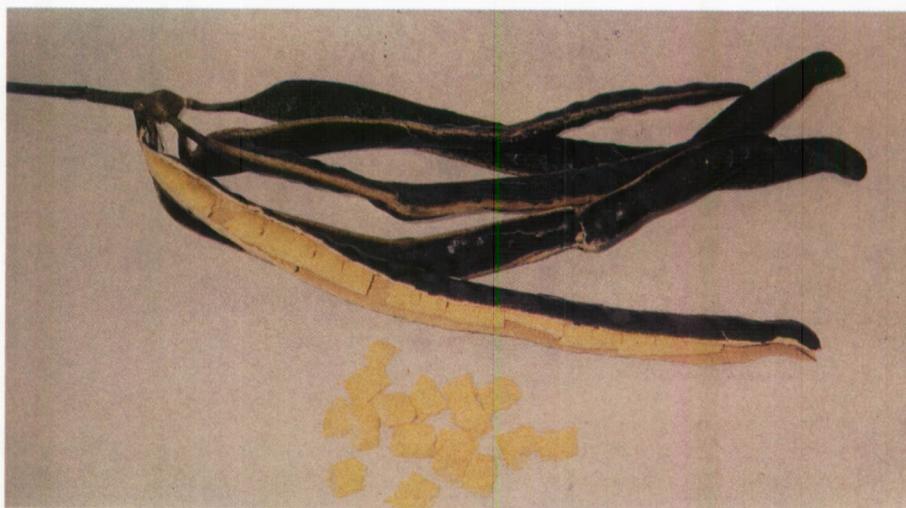


Photo 1. Graines entières de caroube africaine (*Parkia biglobosa*). (Cliché B. N'Dir)

Photo 1. Non-dehulled African locust bean seeds (*Parkia biglobosa*).

res indésirables résultant des diverses manipulations durant le décortiquage.

Fermentation : les cotylédons cuits sont placés après essorage dans des paniers ou des jarres en terre cuite propres et recouverts en surface par des feuilles de bananier (*Musa* sp.) ou des toiles de polyéthylène. Ils sont laissés ainsi à fermenter pendant trois à quatre jours au soleil ou dans un endroit chaud.

La fermentation des cotylédons de caroube africaine (photo 2) suivie d'un séchage au soleil donne un produit fini, le *nététu*, de couleur noirâtre, d'arôme et de saveur caractéristiques et pouvant se conserver pendant plusieurs mois sans précautions particulières, à température ambiante.

Contrairement à la fermentation de beaucoup de produits végétaux, aucun

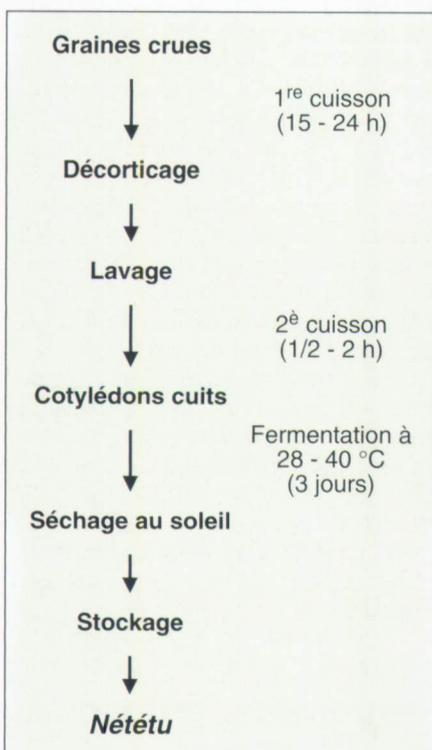


Figure 1. Schéma général de la fabrication traditionnelle du *nététu*.

Figure 1. Flowchart of traditional *netetu* manufacture.



Photo 2. *Nététu* en vente sur le marché de Dakar. (Cliché B. N'Dir)

Photo 2. *Netetu* on sale at the market in Dakar.

ped de cuve ou levain n'est utilisé dans la fabrication du nétéu. Les deux cuissons successives servent donc à préparer le substrat végétal (les cotylédons de caroube) à l'action des micro-organismes sporulés (résistants au traitement thermique) sélectionnés par le procédé.

Matériel et méthodes

Dénombrement et identification des micro-organismes totaux et sporulés

Dix grammes de nétéu préalablement homogénéisés sont dispersés à l'Ultra-Turrax T25 (IKA-Labortechnik) pendant 45 s dans 90 ml d'eau peptonée ajustée à pH = 7. Le comptage des micro-organismes est réalisé par dilution sur une gélose glucosée (peptone 1 %, glucose 0,5 %, agar 1,5 %) contenant 0,004 % de pourpre de bromocrésol et 0,2 % d'amidon soluble (UCB). Ensuite, les boîtes sont incubées à 30 °C pour la flore totale mésophile et à 55 °C pour la flore totale thermophile. Un traitement thermique de la suspension initiale à 80 °C pendant 10 min ou 30 min permet d'obtenir le dénombrement des spores.



Photo 3. Activité antifongique de *Bacillus subtilis* S499 vis-à-vis de *Alternaria* sp. (Cliché B. N'Dir)

Photo 3. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* S.499 against *Alternaria* sp.

Les colonies développées en surface sont ensuite isolées et soumises aux tests classiques de caractérisation des *Bacillus* [14]. La morphologie des formes végétatives et des spores est analysée après culture sur gélose nutritive (peptone 1 %, extrait de viande 0,5 %, NaCl 0,5 %, agar 1,5 %, pH = 7,2) additionnée de 5 mg par litre de $MnSO_4$. Une identification préliminaire a été faite en utilisant la clé de Wolf et Barker [15]. Le profil biochimique des souches est réalisé en utilisant les galeries Api 50 CHB.

Activité antifongique

Les souches isolées et purifiées sont testées pour leur activité antifongique vis-à-vis d'une série de moisissures. *Botrytis cinerea* 1 et 2 et *Penicillium expansum* ont été isolés respectivement sur fraise, poire et pomme par le laboratoire de phytopathologie de la faculté des sciences agronomiques de Gembloux (Belgique). *Fusarium oxysporum radialis lycopersicum*, *Penicillium* sp., *Pythium* sp., *Rhizopus* sp. ont été isolés respectivement sur tomate, pomme, betterave et fraise par notre laboratoire. Les souches de *Bacillus* isolées du nétéu sont inoculées sur le milieu malt agar (Merck) et incubées à 30 °C ou 37 °C pendant 24 h. Ensuite la moisissure est inoculée au centre de la boîte et l'ensemble est incubé à 25 °C pendant trois à cinq jours.

Une activité antifongique est caractérisée par une zone d'inhibition de la croissance du mycelium autour de la colonie. Des tests parallèles sont réalisés avec la souche *Bacillus subtilis* S499 comme décrit précédemment [16]. La photo 3 présente un exemple d'antagonisme obtenu avec la souche S499 vis-à-vis d'*Alternaria* sp.

Production et identification des substances antifongiques

Les micro-organismes présentant une activité antifongique nette sont cultivés en fioles dans le milieu liquide MSL décrit par Jacques *et al.* [16] pendant 72 h à 30 °C sous agitation à 200 t/min. La croissance microbienne est déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Ultraspec II (LKB-Biochrom).

Les antibiotiques en cause sont isolés de l'extrait de nétéu et des cultures liquides des souches de *Bacillus* par la technique de précipitation-extraction [16]. Les échantillons sont amenés à pH 2 avec du HCl 6N, puis centrifugés à 10 000 g pendant 15 min. Le culot obtenu est extrait par un mélange chloroforme-méthanol (2/1, V/V). Les extraits (préparation brute) sont séchés et repris dans du méthanol et analysés par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60. Les solvants utilisés sont le solvant A : chloroforme-méthanol-eau (65/25/4 ; V/V/V) et le solvant B : chloroforme-diméthylformamide-eau (25/22/3 ; V/V/V). La révélation se fait à l'eau et à la ninhydrine. Les lipopeptides contenant une amine secondaire (NH) sont révélés par la technique de chlorination.

Activité hémolytique des antibiotiques

L'activité hémolytique est détectée par incubation (30 min à 37 °C) de partie aliquote (50 µl) de surnageant dans de la gélose au sang de mouton (*Blood agar Base-Difco*). Cette activité est ensuite quantifiée à partir des préparations brutes d'antibiotiques. Les extraits bruts sont repris dans un mélange butanol-acétone (95/1 ; V/V). L'extrait obtenu est séché et repris dans du méthanol ; 20 µl de cette solution sont ajoutés à 980 µl d'une suspension d'érythrocytes de mouton à $5 \cdot 10^7$ cellules/ml (Eco-Bio). L'échantillon est incubé 30 min à 37 °C. L'activité est exprimée en unités d'hémolyse. Une unité d'hémolyse (UH) est la quantité de lipopeptides capable de provoquer 50 % d'hémolyse de la solution d'érythrocytes de mouton.

Résultats

Étude quantitative de la microflore du nétéu

Le tableau 1 présente le dénombrement de la microflore sporulée du nétéu. Les résultats obtenus montrent une flore aérobie mésophile et thermophile, respectivement de $1,8 \cdot 10^9$ et $5,9 \cdot 10^8$ CFU/g. Ce résultat est caractéristique d'un aliment cuit puis fermenté.

Summary

The antifungal properties of the spore-forming microflora of netetu

B. N'Dir, C. Hbid, C. Cornélius, *et al.*

Netetu is a condiment obtained by solid-state fermentation of the seeds of the African locust bean (*Parkia biglobosa*). The fermentation process alters the physical state of the cooked and dehulled beans, giving netetu — a popular protein-rich seasoning — its distinctive taste. The condiment is also an excellent preservative against mould. The spore-forming microflora was investigated quantitatively and qualitatively, mainly for its antifungal properties.

Fifty strains of *Bacillus* were isolated : *B. licheniformis* (42 %), *B. subtilis* (32 %), *B. coagulans* (18 %) and other *B. sp.* (8 %). 8 strains (*A_{5r}*, *A_{6r}*, *B_{4r}*, *B_{6r}*, *B_{11r}*, *BN-01*, *H₇* and *H₁₂*) exhibited an antifungal activity. All these strains except one (*H₁₂*) were similar to *B. subtilis*, and hydrolyzed urea. Two strains (*BN-01* and *H₇*) were antagonistic towards all fungi tested.

Bacillus subtilis is well-known for producing the antifungal lipopeptides known as Iturin. These substances exhibit haemolytic activity. A crude extract of the antifungal substances produced by strains *A_{5r}*, *B_{4r}*, *B_{11r}*, *H₇* and *H₁₂* also caused haemoglobin to be released from erythrocytes, whereas that of *A_{6r}*, *B₆* and *BN-01* strains were less toxic to erythrocytes.

Determination of the lipopeptides produced by netetu and the eight antifungal strains, was performed by TLC. Five spots were found in netetu. One of these corresponded to the Mycosubtilin and another exhibited the same migration pattern as Bacillomycin L. On the other hand, a positive reaction was observed with ninhydrin, which is not the case with Bacillomycin L. Antifungal substances produced by strains *A_{5r}*, *B_{4r}*, *B₁₁* and *H₁₂* were Iturin A and Surfactin. Strains *A_{6r}*, *B₆* and *BN-01* produced a compound with the same retention time as Bacillomycin L. This compound could be a new lipopeptide without haemolytic activity.

Our results could prove useful in selecting and developing starter cultures for standardized netetu production.

Cahiers Agricultures 1994 ; 3 : 23-30.

D'autre part, la proportion de spores observée après 10 min. de traitement thermique à 80 °C est élevée. Un taux de 81,3 % est noté pour les spores poussant à 30 °C et de 74,2 % à 55 °C. Lors d'un traitement thermique de 30 min, ces taux chutent à 74,3 et 24,1 % pour les spores poussant respectivement à 30 et 55 °C.

Étude qualitative de la microflore

Les tests morphologiques et de sporulation ont permis d'isoler cinquante souches de *Bacillus* réparties en deux grands groupes : les anaérobies facultatifs et les aérobies stricts (tableau 2). Neuf souches (18 %) se développent à 60 °C à pH 6 et sont des *Bacillus coagulans* ; 16 souches (32 %) acidifient le milieu glucose-ammonium et sont des *B. subtilis/pumilus*, vingt et une souches anaérobies facultatives et lécithinase-négative appartiennent à l'espèce *B. licheniformis*. Quatre autres *Bacillus sp.* se développent sur glucose en anaérobie.

Les cinquante souches de *Bacillus* ont été testées sur milieu malt agar en ce qui concerne leurs potentialités antifongiques. Seules huit souches ont présenté un antagonisme vis-à-vis des moi-

Tableau 2

Analyse des caractéristiques morphologiques et biochimiques des 50 souches de *Bacillus* isolées

Tests	% de positifs
Formation d'endospores	100
Coloration de Gram	100
Production de catalase	100
Croissance à 60°C, pH 6	18
Croissance sur glucose en anaérobiose	50
Production de lécithinase	0
Acidification sur milieu glucose-ammonium	32
Hydrolyse de l'amidon	88

Morphological and biochemical characteristics of the 50 isolated strains of *Bacillus*

Tableau 1

Dénombrement de la microflore sporulée du nététu

	Nombre (CFU/g)	Spores (%)
Flore totale aérobie à 30 °C	1,8.10 ⁹	—
Flore totale aérobie à 55 °C	5,9.10 ⁸	—
A. Traitement thermique 80 °C/10 min		
Spores poussant à 30 °C	1,5.10 ⁹	81,3
Spores poussant à 55 °C	4,4.10 ⁸	74,2
B. Traitement thermique 80 °C/30 min		
Spores poussant à 30 °C	3,8.10 ⁸	20,9
Spores poussant à 55 °C	3,3.10 ⁸	56,3

CFU = unité capable de former une colonie.

Quantitative analysis of spore-forming microflora isolated from netetu

sissures. Leur spectre d'activité antifongique et leur profil biochimique ont été déterminés (tableau 3). Les résultats du tableau 3 indiquent que les huit souches de *Bacillus* à activité antifongique présentent des profils antifongiques et biochimiques différents. Toutefois, elles sont toutes uréase +, galactose -, rhamnose - et antago-

nistes vis-à-vis de *Rhizopus* sp. qui apparaît comme la moisissure la plus sensible. Les souches A₅, A₆, B₄, B₆, BN-01 et H₇ sont des *Bacillus subtilis*, la souche H₁₂ (*Bacillus* sp.) n'acidifie le milieu qu'en présence de glucose ou de fructose. *B. subtilis* BN-01 et *B. subtilis* H₇ présentent les plus larges spectres antifongiques : ils sont

antagonistes vis-à-vis des sept moisissures testées.

Identification des substances responsables de l'antagonisme

Différents auteurs ont montré que *B. subtilis* produisait des substances anti-

Tableau 3

Spectre antifongique et profil biochimique de huit souches de *Bacillus* du netétu

Tests	Souches de <i>Bacillus</i>							
	A ₅	A ₆	B ₄	B ₆	B ₁₁	BN-01	H ₇	H ₁₂
Antagonisme vis-à-vis de :								
<i>Botrytis cinerea</i> 1	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Botrytis cinerea</i> 2	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>Penicillium expansum</i>	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Penicillium</i> sp.	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Pythium</i> sp.	(-)	(-)	-	-	(-)	+	+	-
<i>Rhizopus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
Acidification à partir de :								
glycérol	+	+	+	+	+	+	+	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	+	-	+	(-)	+	+	+	(-)
galactose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
inositol	+	(-)	+	+	+	+	+	-
mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-
maltose	+	+	+	+	+	+	+	-
saccharose	+	+	+	+	(-)	+	+	-
D-raffinose	+	+	-	+	+	+	+	-
amidon	(-)	+	+	+	+	(-)	+	-
glycogène	+	+	+	+	+	+	+	-
Utilisation du citrate								
Acétoïne	+	+	+	+	+	+	+	+
Urée	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse de la gélatine	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate	-	+	+	+	+	+	-	+
Hémolyse								
	+	(-)	+	+	+	-	+	+
Identification								
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. sp.</i>

+ : réaction franche ; (-) : réaction faible ; - : pas de réaction

Botrytis cinerea 1 : isolé de la fraise (*Fragaria* sp.) ; *Botrytis cinerea* 2 : isolé de la poire (*Pyrus* sp.).

Antifungal activity and metabolic properties of 8 *Bacillus* strains from netetu

fongiques de type lipopeptidique appelées Iturine, Surfactine, Bacillomycine et Mycosubtiline [6-14]. Ces substances sont souvent capables de provoquer l'hémolyse, ce qui réduit d'ailleurs fortement leur usage en tant qu'agent thérapeutique. Parmi les huit souches de *Bacillus* antifongiques sélectionnées, six seulement (A₅, B₄, B₆, B₁₁, H₇ et H₁₂) ont une activité hémolytique franche sur gélose au sang ; la souche A₆ est faiblement hémolytique tandis que la souche BN-01 a une réaction négative à cet égard.

L'activité hémolytique a été quantifiée sur des préparations partiellement purifiées d'antibiotiques (tableau 4). Elle est exprimée en unité d'hémolyse par litre (UH/L). Les souches BN-01, A₆ et B₆ ont les activités hémolytiques spécifiques les plus faibles avec respectivement 0,02, 0,03 et 0,04 UH/DO. Leur faible toxicité sur les hématies ne peut être corrélée à leurs activités antifongiques marquées vis-à-vis de certaines moisissures. Cependant, ces trois souches ont tendance à acidifier le milieu, alors que les souches hémolytiques l'alcalinisent.

Les lipopeptides produits par *B. subtilis* peuvent être identifiés, après une purification partielle, par chromatographie sur couche mince en gel de silice. La présence de ce type de substance antifongique a donc été recherchée à

partir de précipité du *netetu* et dans les surnageants de culture des différentes souches étudiées.

La chromatographie sur gel de silice 60 du précipité acide du *netetu*, révélée dans deux solvants, donne cinq bandes différentes, positives à l'eau et au réactif de chlorination. Ces mêmes bandes sont négatives à la ninhydrine, à l'exception de la bande 0,17 en présence du solvant A et de la bande 0,38 en présence du solvant B. Deux de ces lipopeptides potentiels ont des Rf comparables à ceux des antibiotiques du groupe Iturine (tableaux 5 et 6) [6, 17]. Il s'agit de la bande 0,26 en solvant A et 0,45 en solvant B (tableau 5) qui correspond à la Mycosubtiline (tableau 6). La bande 0,16 en solvant A et 0,38 en solvant B pourrait être de la Bacillomycine L ; toutefois, ce composé répond positivement à la ninhydrine, ce qui n'est pas le cas pour la Bacillomycine L.

L'analyse par chromatographie (tableau 7) sur couche mince des lipopeptides produits par les huit souches antifongiques permet de les classer en trois grands groupes. Les souches A₅, B₄, B₁₁, H₇ et H₁₂ produisent l'Iturine A (bande 0,35 en solvant A et 0,45 en solvant B) et la Surfactine (bande 0,65 en solvant A et 1,00 en solvant B). Les souches A₆ et B₆ produisent trois lipopeptides. L'un d'entre eux présente, comme dans l'extrait brut du

netetu, un comportement chromatographique comparable à la Bacillomycine L (0,16 en solvant A, 0,40 en solvant B) avec une réponse positive avec la ninhydrine. La souche BN-01 possède un profil chromatographique identique aux souches A₆ et B₆ à l'exception d'une bande supplémentaire qui ne migre que dans le solvant A (0,46).

Discussion

L'analyse microbiologique du *netetu* du Sénégal montre une importante microflore sporulée de l'ordre de 10⁸-10⁹ CFU/g composée de *Bacillus* aérobies et anaérobies, mésophiles et thermophiles facultatifs. Les espèces les plus représentées sont *B. licheniformis* (42 %), *B. subtilis* (32 %) et *B. coagulans* (18 %).

Les conditions semi-aérobies qui prévalent en cours de fermentation favorisent la prédominance des germes anaérobies facultatifs tels que *B. licheniformis*, *Bacillus* sp. ainsi que *B. coa-*

Tableau 4

Activité hémolytique de huit souches antifongiques de *Bacillus* du *netetu*

Souche de <i>Bacillus</i>	Croissance (DO ₆₀₀)	pH	Activité hémolytique (UH/l)	Activité hémolytique spécifique (UH/DO ₆₀₀)
A ₅	8,09	7,7	2,2	0,28
A ₆	13,65	6,9	0,4	0,03
B ₄	14,96	8,0	2,8	0,19
B ₆	8,78	6,9	0,4	0,04
B ₁₁	15,36	7,8	3,1	0,20
BN-01	10,66	6,6	0,2	0,02
H ₇	13,44	7,9	2,3	0,17
H ₁₂	18,10	7,7	1,7	0,09

Haemolytic activity of 8 antifungal *Bacillus* strains from *netetu*

Tableau 5

Analyse par chromatographie sur couche mince en gel de silice, dans deux solvants différents, du précipité acide du *netetu*

Rf	Solvant	
	solvant A	solvant B
	0,52	0,20
	0,71	0,25
	0,24	0,32
	0,17	0,38
	0,26	0,47

Solvant A : chloroforme-méthanol-eau (65/25/4 ; V/V/V).

Solvant B : chloroforme-diméthylformamide-eau (25/22/3 ; V/V/V).

Thin-layer chromatography analysis of a crude precipitate of *netetu* in two different solvents

gulangans. Ces souches représentent 68 % des souches isolées. La fermentation des graines de caroube africaine est un processus exothermique [18]. On a montré que, durant la fermentation de 72 h du *dawa-dawa*, l'accroissement de la température (de 26 °C à 46 °C) correspond à une augmentation de la population microbienne et du pH (de 7,1 à 7,9). L'élévation du pH en cours de fermentation est probablement due à l'action des protéases microbiennes. *B. licheniformis* et *B. subtilis/pumilus* mis en évidence dans le *nététu* possèdent de telles enzymes et sont en mesure de dégrader les protéines des graines de caroube africaine cuites. Cette activité protéolytique conduit à la libération de peptides, d'acides ami-

nés et d'ammoniac et contribue positivement à la saveur et à l'arôme du *nététu*.

Les implications de *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilus* sont citées par différents auteurs dans la fermentation du *dawa-dawa* ou *iru* au Nigeria [2-5]. Au contraire, *B. coagulans*, espèce thermophile facultative et de tendance acidifiante, n'est pas encore signalée. *B. coagulans* est homofermentaire en anaérobiose et hétérofermentaire en aérobiose ; il est utilisé industriellement pour la fabrication d'acide lactique [19]. Il participe, probablement par son activité α -galactosidasique, à l'hydrolyse des glucides indésirables (raffinose et stachyose), facteurs de flatulence pré-

sents dans les graines de caroube cuites [20].

Le *nététu* contient une importante population de spores résistantes au barème de traitement thermique de 80 °C pendant 30 min, conditions comparables à celles de la deuxième cuisson des cotylédons de caroube (figure 1). Ceci pourrait expliquer la présence en grand nombre de souches de *B. licheniformis* et *B. coagulans* dont les spores sont très résistantes à la chaleur humide [19].

D'une façon générale, ces microorganismes sporulés seraient responsables d'un important métabolisme secondaire, générateur d'arômes et de métabolites tels que les lipopeptides de type Iturine produits par *B. subtilis*. La Surfactine et l'Iturine sont coproduits en culture liquide par les cinq souches de *Bacillus* A₅, B₄, B₁₁, H₇ et H₁₂. Ces substances antifongiques ne se retrouvent toutefois pas dans le précipité acide réalisé sur un échantillon de *nététu*. En revanche, la Mycosubtiline, mise en évidence dans le *nététu*, n'est pas produite dans le milieu MSL par les souches testées. Ces divergences pourraient résulter de la différence de composition chimique des substrats du *nététu* et du milieu MSL ou encore des conditions de fermentation non similaires. Le milieu MSL pourrait favoriser surtout, du moins en ce qui concerne les souches testées, la coproduction de l'Iturine et de la Surfactine aux dépens de la Mycosubtiline. Sandrin *et al.* [14] ont en effet montré que, dans le milieu synthétique de Landy *et al.* [20], plusieurs souches de

Tableau 6

Valeur des Rf des substances antifongiques du groupe Iturine [6] et de la Surfactine [17] dans deux solvants différents

Rf		Antibiotiques
Solvant A	Solvant B	
0,35	0,45	Iturine A
0,18	0,34	Iturine D
0,60	0,83	Iturine E
0,21	0,42	Bacillomycine D
0,47	0,63	Bacillomycine F
0,16	0,38	Bacillomycine L
0,26	0,45	Mycosubtiline
0,65	1,00	Surfactine

Rf values of Surfactin and antifungal substances from the Iturin group in two different solvents

Tableau 7

Analyse par chromatographie sur gel de silice du contenu lipopeptidique des surnageants de culture des différentes souches étudiées

Souches	A ₅		A ₆		B ₄		B ₆		B ₁₁		BN-01		H ₇		H ₁₂	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
	0,35	0,45	0,16	0,18	0,35	0,45	0,16	0,18	0,35	0,45	0,16	0,18	0,35	0,45	0,35	0,45
	0,65	1,00	0,17	0,30	0,65	1,00	0,17	0,30	0,65	1,00	0,17	0,30	0,65	1,00	0,65	1,00
			0,19	0,40			0,19	0,40			0,19	0,40			0,19	0,40
											0,46					

Thin-layer chromatography analysis of the culture supernatants of the various strains studied

B. subtilis sont en mesure de coproduire à des degrés divers la Surfactine et les antibiotiques du groupe Iturine : Iturine A, Bacillomycine F, Bacillomycine L ou Mycosubtiline. Les niveaux de coproduction de la Surfactine et de l'Iturine sont également influencés par la nature des sources carbonées ou azotées [14].

En revanche, les souches A₆, B₆ et BN-01 produisent un des lipopeptides mis en évidence dans le *nététu*. La réponse positive de cette bande à la ninhydrine et la faible activité hémolytique du surnageant de culture de ces souches ne sont pas compatibles avec les propriétés de la Bacillomycine L. Il pourrait s'agir d'un lipopeptide dont l'activité hémolytique est fortement atténuée, voire inexistante. Son exploitation serait intéressante dans la fabrication du *nététu* et, après étude toxicologique, comme antibiotique.

Conclusion

Les résultats obtenus montrent que la microflore du *nététu* est riche en germes sporulés du genre *Bacillus* représenté par *B. licheniformis*, *B. subtilis/pumilus* et *B. coagulans*. Le rôle joué par chaque espèce dans le développement de la saveur et l'arôme du *nététu* est en cours d'étude dans notre laboratoire pour la sélection de *starters*. Le souci de considérer également, dans la sélection des *starters*, la possibilité de synthèse de lipopeptides à activité antifongique parmi les *Bacillus* impliqués dans la fermentation de graines de caroube africaine (*Parkia biglobosa*) constitue l'incidence pratique principale de cette étude ■

Remerciements

Les auteurs remercient la Communauté française de Belgique (CGRI) et la Direction générale des relations extérieures du ministère de la Région wallonne qui ont financé et facilité ce travail réalisé au Centre wallon de biologie industrielle (CWBI) de l'Université de Liège (Belgique).

Références

- Odufa SA. Carbohydrate changes in fermenting locust bean (*Parkia biglobosa*). *Chem Microbiol Technol Lebensm* 1983 ; 10 : 125-7.
- Jideani IAO, Okeke CR. Comparative study of microorganisms and sensory attributes of condiments from the fermentation of different seeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 1991 ; 41 : 27-34.
- Aderibigbe EY, Odufa SA. Growth and extracellular enzyme production by strains of *Bacillus species* isolated from fermenting African locust bean, iru. *J Appl Bacteriol* 1990 ; 65 : 662-71.
- Ogbadu LJ, Okagbue RN. Fermentation of African locust bean *Parkia biglobosa* seeds. Involvement of different species of *Bacillus*. *Food Microbiol* 1988 ; 5 : 195-200.
- Odufa SA, Oyewole OB. Identification of *Bacillus species* from iru a fermented African locust bean *Parkia biglobosa*. *Prod J Basic Microbiol* 1986 ; 26 : 101-8.
- Ullrich C, Kluge B, Palacz Z, Vater J. Cell-free biosynthesis of surfactin a cyclic lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 1991 ; 30 : 6503-8.
- Besson F, Michel G. Isolation and characterization of new iturins : iturin D and iturin E. *J Antibiot* 1987 ; 40 : 437-42.
- Besson F, Peypoux F, Michel G. Antifungal activity upon *Saccharomyces cerevisiae* of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L and their derivatives ; inhibition of this antifungal activity by lipid antagonists. *J Antibiot* 1979 ; 32 : 828-33.
- Peypoux F, Besson F, Michel G, Delcambe L. Preparation and antibacterial activity upon *Micrococcus luteus* derivatives of iturin A, mycosubtilin and bacillomycin L. Antibiotics from *Bacillus subtilis*. *J Antibiot* 1979 ; 32 : 136-40.
- Peypoux F, Besson F, Michel G, Delcambe L, Das BC. Structure de l'Iturine C de *Bacillus subtilis*. *Tetrahedron* 1978 ; 34 : 1147-52.
- Besson F, Peypoux F, Michel G, Delcambe L. Mode of action of iturin A, an antibiotic isolated from *Bacillus subtilis*, on *Micrococcus luteus*. *Biochem Biophys Res Comm* 1978 ; 81 : 297-304.
- Besson F, Peypoux F, Michel G, Delcambe L. Characterisation of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. *J Antibiot* 1976 ; 29 : 1043-9.
- Delcambe L. L'Iturine. *Bull Soc Chim Belge* 1965 ; 74 : 315-28.
- Sandrin C, Peypoux F, Michel G. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. *Biotech appl Biochem* 1990 ; 12 : 370-5.
- Guiraud J, Galzy P. *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires*. Paris : Les éditions de l'Usine Nouvelle, collection Génie alimentaire, 1980 : 86-7.
- Jacques P, Hbid C, Vanhentenryck F, et al. Quantitative and qualitative study of the production of broad-spectrum antifungal lipopeptides from *Bacillus subtilis* S499. *Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology*, Florence, 13-17 juin 1993 (sous presse).
- Vater J. Lipopeptids, an attractive class of microbial surfactants. *Prog Colloid Polymer Sci* 1986 ; 72 : 12-8.
- Antai SP, Ibrahim MH. Microorganisms associated with african locust bean (*Parkia filicoidea* Welw) fermentation for *dawa-dawa* production. *J Appl Bacteriol* 1986 ; 61 : 145-8.
- Frazier WC, Westhoff DC. *Food Microbiology*. 3rd ed. New York : McGraw-Hill Book Company, 1978 ; 540 p.
- Landy M, Warren GH, Roseman SB, Colio LG. Bacillomycin, an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic-fungi. *Proc Soc Exp Biol Med* 1948 ; 67 : 539-41.

Résumé

La microflore sporulée du *nététu*, condiment végétal obtenu par fermentation solide de graines de caroube africaine (*Parkia biglobosa*), a été caractérisée. Les cinquante souches isolées appartiennent au genre *Bacillus*, avec *B. licheniformis*, *B. coagulans* et *B. subtilis* comme espèces dominantes. Huit souches montrent une activité antifongique avec des profils biochimiques différents : il s'agit d'un *B. sp.* (H₁₂) et de sept souches similaires à *B. subtilis* uréase + (A₅, A₆, B₄, B₆, B₁₁, BN-01 et H₇). L'analyse par chromatographie sur couche mince de gel de silice des surnageants de cultures liquides des souches A₅, B₄, B₁₁, H₇ et H₁₂ met en évidence des substances lipopeptidiques similaires à l'Iturine A et à la Surfactine, dont les propriétés antifongiques et hémolytiques sont connues. En revanche, l'analyse des surnageants A₆, B₆ et BN-01 révèle la présence d'un lipopeptide de nature inconnue, identique à celui trouvé dans un extrait brut de *nététu*. Les résultats obtenus permettent de proposer des orientations en ce qui concerne la sélection de *starters* pour la production contrôlée du *nététu*.