



Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Etude des levures endogènes de *Evodia bilahe* (Rutaceae) endémique de Madagascar

Pamphile MANANJARA ¹, Herisetra Lalaina TSIRINIRINDRAVO ^{2*},
Marson RAHERIMANDIMBY ² et Ando RANDRIANIERENANA ²

¹Université de Mahajanga,

²Département de Biochimie Fondamentale et Appliqué, Faculté des Sciences d'Antananarivo, Université de Madagascar, BP 906, Antananarivo 101, Madagascar.

*Auteur correspondant ; E-mail : tehachelone@yahoo.fr

RESUME

Evodia bilahe, un arbre endémique de Madagascar, de la famille des Rutaceae, est utilisé à des fins diverses et son écorce est surtout utilisé pour servir de levain dans la fabrication de Betsabetsa (bière artisanale). Cette plante se rencontre surtout sur les deux versants (Est et Ouest) de la chaîne montagneuse de Marojejy. D'après la logique biotechnologique, elle pourrait donc renfermer de la levure fermentaire du genre *Saccharomyces*. Cette étude aurait pour objectif d'isoler, de purifier et d'identifier les levures sauvages contenues dans l'écorce d'*Evodia bilahe*. Des méthodes classiques d'isolement microbien ont été entreprises, telles que l'isolement sur milieu YGC. Deux souches ont été retenues : une souche blanche et une souche rose. Après identification en se basant sur les caractères culturels, morphologiques, physiologiques, biochimiques (galerie Api *Candida*) et génétiques, la souche blanche a été reconnue comme étant l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, levure responsable de la fermentation alcoolique, et la souche rose appartient à l'espèce *Rhodotorula glutinis*, qui participe à la formation de l'arôme et du goût du produit alcoolisé. La souche blanche, contrairement à la souche rose, est fermentaire.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: *Evodia bilahe*, Rutaceae endémique, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis*, Madagascar.

A study of the endogeneous *Evodia bilahe* (Rutaceae) yeast, endemic of Madagascar

ABSTRACT

This study aims to insulate, purify and detect wild yeast contained in the *Evodia bilahe* bark, a Malagasy endemic tree belonging to the Rutaceae branch which can be used in various targets. Its bark is primarily utilized as leaven Betsabetsa (an artisanal beer) manufacturing. This plant can be found on both sides (Eastern and Western) of the Marojejy mountainous chain. Based on biotechnological logic, it is likely to contain *Saccharomyces* yeast. Classical germ isolating method, namely YGC isolating medium is carried out. As a result, two strains can be retained: the white and pink ones. According to cultural, morphological, physiological, biochemical (Analytical Profile Index : API *Candida*) and genetic analyses, the white strain

belongs to *Saccharomyces cerevisiae* species, whereas the pink strain is among *Rhodotorula glutinis* species, one that plays a major part in alcoholic drink flavor and taste. In contrast with the pink strain, the white one can be used in fermentation.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: *Evodia belahe*, endemic Rutaceae, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis*, Madagascar.

INTRODUCTION

Le « Betsabetsa », une boisson alcoolisée typiquement malgache, occupe une place importante dans la vie coutumière et traditionnelle des malgaches. Diverses plantes peuvent être utilisées lors de sa fabrication mais la plus utilisée est *Evodia belahe*, une plante endémique de la famille des Rutaceae, actuellement en voie de disparition due à l'exploitation abusive de son écorce pour la production artisanale de la boisson.

Le fait que le « Betsabetsa » soit produit, par fermentation de *Evodia belahe*, sans apport d'agent fermentaire exogène, amène à penser que la plante renferme une flore microbienne à caractères fermentaires, en particuliers des levures. En effet, les levures sont des habitants communs des plantes (Lahance et al., 2009 ; Rosa et al., 2009) et de nombreuses expérimentations ainsi que la production artisanale ou industrielle de diverses boissons alcoolisées ont prouvé que les levures sont les principaux agents de la fermentation alcoolique et en particulier le *Saccharomyces cerevisiae*. Des études ont aussi montré que des levures trouvées dans ces boissons contribuent aussi à l'affinage en étant des précurseurs d'arômes ou de saveurs caractéristiques (Storici et Resnick, 2006).

Aucune étude des levures du « Betsabetsa », ni de *Evodia belahe* dénommé à Madagascar « le ferment de rhum », n'a encore été faite jusqu'à maintenant. Nous avons mené une étude microbiologique de l'extrait, préparé à partir de l'écorce de *Evodia belahe*, afin d'isoler, de caractériser et d'identifier les levures de la plante,

notamment les levures responsables de la production du « Betsabetsa » donc le ou les agent(s) de la fermentation alcoolique et les précurseurs de l'arôme de la boisson.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Matériel végétal

L'écorce de *Evodia belahe*, une rutacée endémique de Madagascar constitue le matériel végétal pour cette étude. Elle a été récoltée sur les deux versants (Est et Ouest) de la chaîne montagneuse de Marojejy, Région Atsinanana de Madagascar en avril 2013. La photo 1 présente les écorces de cette plante.

Réactifs pour les études microbiologiques

Le milieu YGC (yeast extract 1% ; triptone 1% ; glucose 2g ; chloramphénicol 0,025%) a été utilisé pour la croissance des levures et l'Agar pour la solidification de ce même milieu. Le milieu YGC additionné du vert de bromocrésol (YGC+B) et le milieu contenant de la lysine (YLC) ont été utilisés pour différencier la levure du genre *Saccharomyces cerevisiae* des autres levures sauvages que renferme cette plante. La galerie API *Candida* a été utilisée pour l'identification des souches isolées à partir de la plante.

Méthodes

Préparation de la suspension mère

Vingt cinq grammes de l'écorce fraîche de *Evodia belahe* ont été broyées, puis mises en suspension dans 225 g de tryptone sel selon la norme NF V 08 002. Après homogénéisation, le tout est laissé reposer pendant 20 min sous la hotte à flux laminaire,

et la suspension mère est obtenue (AFNOR, 1988).

Isolement, purification

Un millilitre de la suspension mère a été inoculé à la surface du milieu YGC dans une boîte de Pétri. Ce milieu est sélectif pour les levures. Le tout a été incubé à 30 °C pendant 5 jours. Cependant, la culture est toujours vérifiée toutes les 24 h car les temps de générations des espèces levuriennes peuvent être différents. Le test a été réalisé en 2 exemplaires (Christiane, 2000). Chaque colonie a été ensuite repiquée sur le même milieu dans d'autres boîtes de Pétri, et ensemencée selon la technique de l'épuisement. La culture a été incubée à 30 °C pendant 48 h. La purification est achevée quand une souche pure, constituée par un seul type de colonie a été obtenue (Guiraud et Rosa, 2010 ; Larpent, 1997 ; Joffin et Leyral, 2006).

Identification

L'identification microbienne était entreprise selon plusieurs étapes, telles que : l'étude des caractères culturels et morphologiques, l'étude des caractères physiologiques, l'étude des caractères biochimiques et l'étude des caractères génétiques (Guiraud et al, 2010 ; Le Minor, 1998 ; Larpent, 1998 ; Levril, 1997).

Pour l'étude des caractères culturels, la souche à identifier a été repiquée et ensemencée sur milieu YGC en boîte de façon à obtenir des colonies isolées. Une incubation 30 °C pendant 48 h a été entreprise. Après ce temps, les caractéristiques des colonies comme la taille, la forme, la chromogénèse, le relief, le contour, la transparence et la consistance ont été analysées.

L'observation à l'état frais et la coloration Gram constituent l'étude des caractères morphologiques de la souche. Pour l'observation à l'état frais : la morphologie, le mode de regroupement, la mobilité, ainsi que l'étude du pseudo filamentation ont été

déterminés. Elle consiste à vérifier la production par les levures d'une succession de bourgeons allongés, produits en chaînes ramifiées. Chaque bourgeon s'allonge d'une certaine longueur sans se détacher de la cellule mère et des bourgeons précédents.

Quant à l'étude des caractères physiologiques, elle consiste à déterminer le type respiratoire du germe et les enzymes du type respiratoire telles que la catalase et l'oxydase.

Les caractères biochimiques des levures à étudier étaient déterminés en utilisant la galerie API *Candida*. C'est une galerie biochimique constituée par des milieux déshydratés permettant de savoir la ou les sources de carbones, d'azote, la voie métabolique,... des levures, ainsi, elle permet d'avoir les équipements enzymatiques du germe à étudier (Guiraud et al., 2003 ; Horton, 1994).

Etude du pouvoir fermentaire

La comparaison du pouvoir fermentaire entre les souches obtenues avec la levure boulangère *Saccharomyces cerevisiae* a été effectuée. Ceci consiste à ensemencer la souche à étudier dans un tube à essai contenant le milieu bouillon nutritif et la cloche de Durham y est introduite. Après 3 jours d'incubation à 25 °C, la cloche de Durham remonte petit à petit la surface. C'est un signe d'une fermentation alcoolique par la levure suivi du dégagement du gaz CO₂ qui est récupéré dans la cloche (Christiane, 2000).

Différentiation de levures

Cette technique consiste à mettre en évidence les contaminants de la levure au sein d'une population étudiée. Le milieu YGC gélatinisé est utilisé pour le dénombrement des levures mais peut également permettre la différenciation des levures par substitution du glucose par la lysine. Ainsi, l'utilisation du milieu contenant de la lysine (YLC), qui est une source d'azote, a pour but de faire pousser

la levure sauvage autre que la levure du genre *Saccharomyces*, qui est inhibée par la lysine.

Pour différencier *Saccharomyces cerevisiae* des autres levures de couleur blanche, le milieu YGC additionné de vert de bromocresol (YGC+B) est utilisé. Les souches fermentaires réduisent ce milieu et produisent ainsi des colonies vertes (Joffin et Leyral, 2006).

Etude des caractères génétiques

Une analyse par PCR ITS et PCR Delta de l'ADN extraite des deux souches a été effectuée pour leur identification. PCR ITS permet d'amplifier une partie de l'ADN ribosomique, la région ITS (Internal Transcribed Spacer) des levures, moisissures ou bactéries. PCR delta est une technique basée sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) des régions du génome situées entre les éléments delta, portions d'ADN dispersées en nombre variable selon la souche de levure. Seul *Saccharomyces cerevisiae* possède ces éléments delta, ainsi cette technique n'est appliquée qu'à cette espèce (Storici et al., 2006 ; Watson et al., 1988).

RESULTATS

Isolement, purification

Après incubation de la culture sur milieu YGC, deux types de colonies ont été obtenues : une colonie blanche, ronde, bombée, opaque, de 0,5 à 1,5 mm de diamètre ; et une colonie rose qui est claire, ronde, bombée huileuse, lisse, opaque, de 0,5 à 1,5 mm de diamètre. Après purification, deux souches pures ont été obtenues. Elles sont notées SB pour la souche blanche et SR pour la souche rose (photo 2 et 3). La souche blanche pousse assez tardivement (96 h) par rapport à la colonie rose (72 h).

Après observation microscopique, on a pu identifier des cellules isolées de forme ovoïde pour les deux souches. Cependant, une succession de bourgeonnement ; la présence

de double membrane ; la formation de cellule haploïde et diploïde ont été notées pour la souche blanche.

Les caractères biochimiques des deux souches (blanche et rose) ont été ensuite déterminés sur Galérie Api *Candida* BioMerieux. Le Tableau 1 donne les résultats de l'identification des deux souches de levures sur galérie Api.

Par ailleurs, les deux souches ont été ensemencées sur milieu YLC (milieu contenant de la lysine comme facteur de différenciation). La souche rose a poussé sur ce milieu, contrairement à la souche blanche. Toutes les levures ont la capacité de se développer sur ce milieu sauf l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, la souche blanche appartient donc à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et la souche rose à *Rhodotorula glutinis*.

Parallèlement, l'étude du pouvoir fermentaire des deux souches a été effectuée en présence d'une souche témoin : la levure boulangère. La souche blanche est fermentaire (se traduisant par la montée de la cloche de durham), contrairement à la souche rose. En outre, le pouvoir fermentaire de la souche blanche est identique à celui de la levure boulangère.

La souche blanche (*Saccharomyces cerevisiae*) présente un intérêt biotechnologique considérable. Ainsi, une analyse des caractères génétiques de *Saccharomyces cerevisiae* isolée de *Evodia belahe* (plante endémique malgache) a été effectuée pour confirmer les résultats obtenus. Il s'agit d'une analyse par PCR ITS et PCR Delta de l'ADN extraite de cette souche. La Photo 4 montre les résultats de ces analyses.

Le résultat de l'amplification a montré qu'il s'agit d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* pure (souche blanche). La souche rose appartient à l'espèce *Rhodotorula glutinis*.

Tableau 1 : Résultat des caractères biochimiques des deux souches (souche blanche et rose).

	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO
Souche blanche	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Souche rose	+	+	+	+	-	+	-	-	+

	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF
Souche blanche	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Souche rose	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-

GLU : D-GLucose, GLY : GLYcérol, 2KG : Calcium 2-céto-Gluconate, ARA : L-Arabinose, XYL : D-XYlose
 ADO : ADOnitol, XLT : XyLiToI, GAL : D-Galactose, INO : INOsitol;
 SOR : D-Sorbitol, MDG : Méthyl- α D-Glucopyranoside, NAG : N-Acétyle-Glucosamine, CEL : D-CELLobiose, LAC : D-LACTose (origine bovine), MAL : D-Maltose, SAC : D-SACcharose, TRE : D-TREhalose, MLZ : D-MÉLézitose, RAF : D-RAFFinose



Photo 1 : Ecorce de *Evodia belahe*



Photo 2 : Souche blanche de *EB* isolée



Photo 3 : Souche roses de *EB* isolée

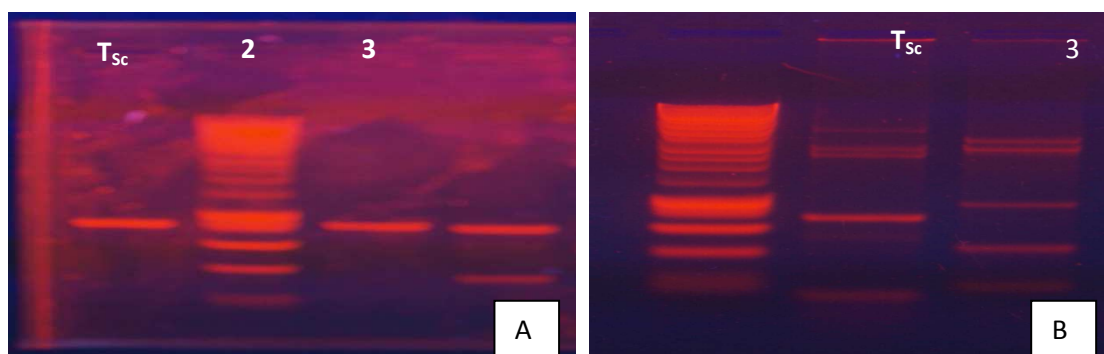


Photo 4 : A : PCR ITS et B : PCR Delta.

T_{sc} : *S.cerevisiae* témoin, 2 : MW, 3 Souche blanche

DISCUSSION

Deux types de colonies ont été obtenus après ensemencement de la suspension mère à partir de l'écorce de *Evodia belahe*, un arbre endémique de Madagascar, de la famille des rutacées. Il s'agit de la colonie blanche et de la colonie rose. Ainsi, deux types de levures se trouvaient sur cet échantillon. L'isolement et la purification et l'identification de chaque souche ont été ensuite effectués.

L'identification s'est basée sur l'étude des caractères morphologiques et culturels, physiologiques, biochimiques (en utilisant la galerie Api *Candida*) ainsi que l'étude des caractères génétiques par amplification génétique PCR ITS et PCR Delta, deux méthodes spécifiques pour les levures. Ainsi, la souche blanche a été identifiée comme étant *Saccharomyces cerevisiae* et la souche rose *Rhodotorula glutinis*. Lors de la comparaison du pouvoir fermentaire de la souche de *Saccharomyces cerevisiae* isolée à partir de l'écorce de *Evodia belahe* et la levure boulangère, une activité similaire a été constatée. Par contre la souche rose (*Rhodotorula glutinis*) est non fermentaire, en effet, la cloche de Durham est restée au fond du tube.

Ces résultats apportent une explication scientifique à l'utilisation empirique de *Evodia belahe*, pour la fabrication du « betsabetsa », une boisson alcoolisée artisanale malgache. *Saccharomyces*

cerevisiae transforme les sucres fermentescibles (glucose, fructose, saccharose) en éthanol, tandis que *Rhodotorula glutinis* est responsable de la production d'aromes ou de saveurs caractéristiques.

En effet, les travaux de KÖNIG montrent que *Rhodotorula glutinis* et *Saccharomyces cerevisiae* font parties de la flore normale de nombreux fruits. Sur la grappe de raisin, 22 genres de levures en symbiose ont été identifiés. Parmi eux *Rhodotorula*, *Aerobasidium*, *Cryptococcus*, *Rhodosporidium*, produisent l'arome spécifique, tandis que *Saccharomyces cerevisiae* est responsable de la production d'alcool (fermentation). Cependant, les microorganismes présents sur les grappes de raisin peuvent varier selon le degré de maturité du fruit mais également le climat (König et al, 2013).

Par ailleurs, *Rhodotorula glutinis* a été identifiée parmi les 23 espèces de levures isolées à partir des nectarines. Cette levure est responsable de la production d'arome de nombreux fruits tels que le raisin et la pomme (Kurtzman et al, 2010). *Rhodotorula glutinis* produit l' α -L-arabinofuranosidase, une enzyme à intérêt biotechnologique qui intervient lors de la production de nombreuses molécules volatiles telles que des monoterpènes dérivés de l'acide shikimique, des β -D-glucosides, responsables de la saveur

de nombreux fruits tels que le raisin (Fleet G.H, 2011 ; Martinez et al, 2006).

En outre, *Saccharomyces cerevisiae*, mis dans les conditions optimales de croissance (Température égale à 29,7 °C, pH égal à 4,8) produit de l'éthanol à 15,26% (v/v), 0,02% d'alcool isoamylique et 0,01 % de méthyl-2propanol-1, à partir de sucres fermentescibles obtenus à partir des pailles de riz (Tsrinirindravo et Rabetsimalona, 2014).

REFERENCES

- AFNOR. 1988. Norme NF ISO 7954. Dénombrement de levures et de moisissures : Technique par comptage de la colonie à 25 °C. 20p.
- AFNOR. 1995. Norme XP V086059. Dénombrement de levure et de moisissures par comptages de colonie à 25 °C. Méthode de la routine : Manuel de microbiologie. 12p.
- Christiane J. 2000. *Microbiologie Alimentaire* (5e éd). CRDP d'Aquitaine ; 210p.
- Fleet GH. 2011. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Ed Springer: London; 140p.
- Guiraud JP, Rosec JP. 2010. *Pratique des Normes en Microbiologie Alimentaire*. AFNOR ; 300 p.
- Guiraud JP. 2003. *Microbiologie Alimentaire*. Edition Nathan ; 400p.
- Horton H, Moran L, Ochs R, Rawn J, Scrimgeour K. 1994. *Principes de Biochimie*. De Boeck – Wesmael SA : Bruxelles ; 320p.
- Guiraud J-P. 1998. *Microbiologie Alimentaire*. Règles générales pour les examens microbiologiques. Paris. 450p.
- ISO. 1996. *Microbiologie*. Directive pour la préparation des dilutions en vue de l'examen en microbiologie. 40p.
- Janine R, Bhupesh CD, Christiane K-F, Pierre P, Judith P. 1968. Étude des constituants de *Evodia Belahe* Baillon (Rutacées). *Phytochemistry*, **7** : 1019-1026.
- Joffin JN, Leyral G. 2006. *Microbiologie Technique* (Tome 1. 4e éd). CRDP d'Aquitaine ; 210p.
- König H, Gottfried U, Fröhlich J. 2013. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Ed Springer: London; 690p.
- Kurtzman CP, Janisiewicz, Buyer JS. 2010. Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. *Yeast*. Jul, **27**(7) : 389-98.
- Larpent J-P. 1997. *Microbiologie Alimentaire : Technique de documentation*. Paris. 472p.
- Larpent J-P. 1997. *Microbiologie des Aliments : Techniques de Labo*. Technique et documentation Lavoisier: Londres, Paris, New York ; 130p.
- Larpent J-P, Larpent-Gourgaud M. 1997. *Mémento Technique de Microbiologie* (3e éd). Lavoisier : Londres, New York, Paris ; 1039 p.
- Larpent J-P, Larpent-Gourgaud M. 1970. *Microbiologie Pratique*. Hermann : Paris ; 203p.
- Le Minor L, Richard C. 1998. *Méthodes de Laboratoire pour l'Identification des Entérobactéries*. Institut Pasteur : Paris ; 217p.
- Levrat G, Vierling E. 1997. *Microbiologie et Toxicologie des Aliments : Hygiène et Sécurité Alimentaires* (2e éd). Doin éditeurs : Alsace-Lorraine ; 350p.
- Larpent J-P, Larpent-Gourgaud M. 1970. *Microbiologie Pratique*. Hermann : Paris ; 203p.
- Martinez C, Gertosio C, Labbe A, Perez R, Ganga MA. 2006. Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes α -L-arabinofuranosidase. *Electronic Journal of Biotechnology*, **9**(4).
- Meyer A, Dejana J, Leclerc H. 1984. *Cours de Microbiologie Générale*. Doin Editeur : Paris ; 309p.
- Mourthadhoi M, Boeuf J, Quaglia E. 1999. *Observation Microscopique : Coloration de Gram*. Paris. 150p.

- Murray PR, Baron EJ, Pfaller M, Tenover FC, Tenover VC. 1999. *Manual of Clinical Microbiology* (7e édn). ASM Press: Washington D.C; 1547p.
- Storici F, Resnick M. 2006. *The delitto perfetto* approach to *in vivo* site-directed mutagenesis and chromosome rearrangements with synthetic oligonucleotides in yeast. *Methods Enzymol.*, **409** : 329-345.
- Schaechter, Medoff, Eisenstein. 1999. *Microbiologie et Pathologie Infectieuse* (2e édn). De Boeck & Larcier s.a. : Paris, Bruxelles; 234p.
- Stanley TW, Sharpe ME, Holt JG. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins, 4: Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo; 2299-2648.
- Tsirindiravato HL, Rabetsimalona HM. 2014. Valorisation de la paille de riz (*Oriza sativa*) en vue de la production d'éthanol. *Terre d'Espoir*, **7** : 14-17.
- Watson DJ, Hopkins N, Roberts J, Steitz J, Weiner A. 1988. *Molecular Biology of the Gene*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.: New York. 12; 1789-1799.