

EVOLUTION DE LA MICROFLORE ET DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE DES AMANDES DE TOURNESOL PENDANT LE STOCKAGE

MARIE-CLAUDE GUENOT et JEANNE POISSON
(France)

L'amande décortiquée de tournesol est considérée comme étant un matériel fragile qui s'altère rapidement, mais les modifications qui se produisent dans sa composition lipidique au cours du stockage n'ont fait l'objet que de peu d'investigations.

Jusqu'alors, c'est surtout l'acidité grasse de la graine entière qui a été suivie aussi bien pendant la maturation que durant le stockage (Masson et Chanet, 1962; Masson, 1963; Scherbakov et Devterov, 1968).

Les modifications de la composition en acides gras de l'huile des graines de tournesol ont été étudiées pendant la maturation (Scherbakov et Silantiev, 1970), suivant la position de l'akène sur le capitule (Zimmerman et Fick, 1973) et pendant le stockage.

Naudet (1968) a analysé la composition en tri- di et mono-glycérides des lipides extraits de plusieurs échantillons de graines de tournesol ayant des acidités différentes; il a constaté qu'il n'y a accumulation ni de diglycérides ni de monoglycérides, ce qui laisserait supposer que les lipases n'ont pas de spécificité d'action vis-à-vis des positions internes ou externes des triglycérides.

Dans des akènes ayant des teneurs en eau de 4,3 — 13,7 et 15 p. 100, Mc Gee et Christensen (1970) ont retrouvé, après un mois de stockage à 25°C, des quantités accrues d'acides palmitique, oléique, et linoléique; l'augmentation étant d'autant plus forte que la teneur en eau est plus élevée.

En ce qui concerne les causes des changements qui affectent la composition de l'huile dans les amandes pendant le stockage, l'action d'une lipase propre de la graine ne semble pas avoir été mise en évidence.

Les recherches de ces dernières années ont surtout porté sur le rôle joué par les lipases des moisissures des graines dans le processus de dégradation de leurs glycérides.

Dans la zone hydrique et thermique de prolifération des moisissures, au cours de stockages effectués en atmosphère libre ou renouvelée, il existe une bonne corrélation entre l'augmentation du nombre de germes fongiques et l'augmentation de l'indice d'acide (Guilbot et Poisson, 1966). Par la suite, Naudet (1968) a montré que les moisissures se développant sur tournesol ont une activité lipolytique et sont donc susceptibles de participer au processus de libération des acides gras. Mais dans les conditions de stockage qui permettent leur développement, sont-elles seules à intervenir dans ce phénomène ou y a-t-il d'autres lipases qui agissent en même temps ? Pour l'instant, il n'y a pas de réponse nette à ces questions. Pourtant il ne faut pas perdre de vue que dans les conditions de stockage qui entraînent une stabilisation ou une régression de la microflore, il y a néanmoins une acidification de l'huile dans les amandes (Poisson et al., 1972).

Cherchant à réunir plus d'éléments de discussion sur les causes et la nature de ces dégradations, qu'elles soient liées ou non à l'activité des moisissures, nous avons tout d'abord suivi l'évolution de la microflore et des lipides, plus particulièrement des acides gras libres, d'amandes de tournesol stockées en atmosphère libre dans différentes conditions hydriques et thermiques. Par la suite, afin d'essayer de définir la part due aux lipases des moisissures et à celle d'une éventuelle lipase des amandes, la libération d'acides gras a été étudiée, d'une part sous l'action des moisissures dans des milieux modèles à base d'amandes broyées de tournesol dépourvues d'enzymes, et d'autre part dans des amandes décontaminées.

MATÉRIEL BIOLOGIQUE — MODE OPÉRATOIRE ET MÉTHODES D'ANALYSES

Les essais sont effectués avec des amandes de tournesol (INRA 65—01) décortiquées à la main, ayant initialement un indice d'acide de 1,6 et une teneur en eau de 4,5 p. 100 de la substance humide (sh).

Les amandes décontaminées sont obtenues, par plusieurs nettoyages des amandes décortiquées, à l'aide de tissus secs stériles. Pour contrôler la stérilité du lot d'amandes, on effectue un examen au microscope de leur surface et de coupes après coloration au bleu coton. En outre, un cinquième des amandes du lot, est déposé sur milieu de culture en boîte de Pétri.

Le milieu modèle dépourvu d'enzymes, est constitué par des amandes broyées, délipidées, stérilisées à l'autoclave, auxquelles est réincorporée la matière grasse extraite à l'hexane et à l'éther après filtration stérilisante sur membrane.

Les souches de *Penicillium brevi-compactum* et d'*Aspergillus repens* ont été isolées à partir d'amandes moisies.

Les amandes amenées à la teneur en eau désirée (4,5—6,8 et 8,6 p. 100) sont stockées à 5, 13 et 22°C sous des humidités relatives de 47—80 et 90 p. 100, en équilibre hydrique avec des solutions saturées de K_2CO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, $KCrO_4$.

La teneur en eau des amandes est déterminée suivant la norme AFNOR NF V 03 903, établie pour les graines oléagineuses.

Le dénombrement des microorganismes est effectué suivant la méthode des „dilutions — ensemencements“, la suspension mère étant obtenue par broyage des amandes dans le diluant.

L'indice d'acide de l'huile des amandes est déterminé d'après la norme AFNOR NF V 03 906. Les résultats sont exprimés en milligrammes de potasse nécessaires pour neutraliser 1 gramme de matière grasse.

Les proportions des différents glycérides par rapport à l'ensemble des mono, di, triglycérides et acides gras libres, sont évaluées par densitométrie après séparation par chromatographie sur couche mince et révélation par pulvérisation d'acide sulfurique.

L'évolution qualitative et quantitative des acides gras libres est suivie par chromatographie sur couche mince et en phase gazeuse, d'après la méthode décrite de Drapron et Sclafani (1969) du dosage de l'activité lipolytique.

RÉSULTATS OBTENUS

1. EVOLUTION DE LA MICROFLORE ET DES LIPIDES D'AMANDES ENTIÈRES DÉCOR- TIQUÉS AU COURS DU STOCKAGE

a) Evolution de la microflore.

— *Bactéries*. Les bactéries n'augmentent dans aucun lot au cours du stockage des amandes : elles se stabilisent à 5°C et diminuent par ailleurs d'autant plus rapidement que la température s'élève.

En première approximation on ne saurait rendre les bactéries responsables des dégradations qui surviennent dans les amandes au cours du stockage dans nos conditions expérimentales.

— *Moisissures* — sous une humidité relative de 90 p. 100 :

- à 22 et 13°C (fig. 1A), le développement des moisissures est rapide au début de l'essai ; pendant les 3 premières semaines leur nombre est multiplié par 150, puis la vitesse d'accroissement diminue et s'annule. Des *Aspergillus* (*Aspergillus repens*, *Aspergillus amstelodami* et *Aspergillus ruber*) et surtout des *Penicillium* (*Penicillium brevicompactum*) prédominent dès le début et se maintiennent.
- à 5°C, par contre, on assiste à une légère régression des moisissures pendant le premier mois, puis à une augmentation due à la multiplication de *Penicillium* et d'*Aspergillus*.

— sous une humidité relative de 80 p. 100 :

- à 22 et 13°C (fig. 1A), les moisissures se multiplient moins rapidement (1 000 fois moins en 3 mois à 13°C) que précédemment, mais la flore dominante est cette fois constituée par plus d'*Aspergillus* que de *Penicillium*.
- à 5°C, le nombre de moisissures ne varie pas pendant 6 mois, puis diminue.

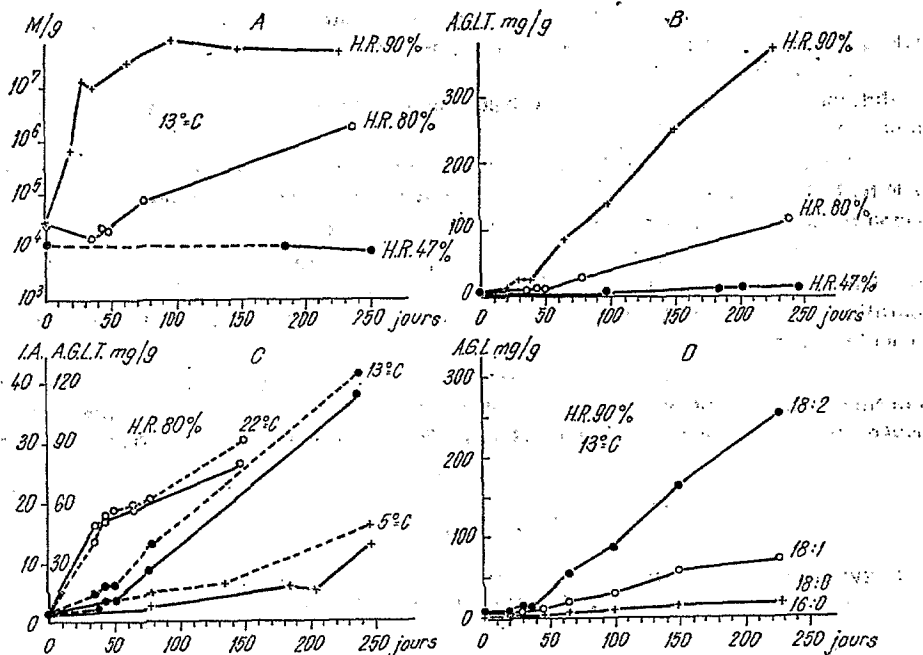


Fig. 1 — A. Evolution de la mycoflore d'amandes de tournesol, décortiquées, entières, au cours d'un stockage effectué en atmosphère libre à 13°C; + sous une humidité relative de 90 p. 100; O sous une humidité relative de 80 p. 100; • sous une humidité relative de 47 p. 100; — abscisse: durée de stockage en jours; ordonnée: nombre de germes de moisissures par gramme d'amande

B Evolution de la quantité d'acides gras libres totaux d'amandes de tournesol, décortiquées entières, au cours d'un stockage effectué en atmosphère libre à 13°C; + sous une humidité relative de 90 p. 100; O sous une humidité relative de 80 p. 100; • sous une humidité relative de 47 p. 100; abscisse: durée de stockage en jours; ordonnée: quantité d'acides gras libres totaux calculée en mg par gramme d'amandes sèches

C. Evolution de la quantité d'acides gras libres totaux (trait plein) et de l'indice d'acide (trait pointillé) de l'huile extraite d'amandes de tournesol à O 22°C; • 13°C; X 5°C; abscisse: durée de stockage en jours; ordonnée: indice acide — quantité d'acides gras libres totaux en mg/gramme d'amandes sèches

D Evolution des quantités d'acides gras libres prépondérants des amandes de tournesol, décortiqué entières, au cours d'un stockage effectué à 13°C sous une humidité relative de 90 p. 100: • acide linoléique; O acide oléique; + acides stéarique et palmitique; abs cisse: durée de stockage en jours; ordonnées: mg d'acides gras libres par gramme d'amandes sèches.

— sous une humidité relative de 47 p. 100 (fig. 1A):

- La population fongique diminue très lentement dans tous les essais
- b) Evolution des glycérides et des acides gras libres.

— *Glycérides*. La proportion de triglycérides par rapport à l'ensemble glycérides et acides gras libres, diminue dans tous les lots, au cours du stockage, d'autant plus que la teneur en eau des amandes et la température sont plus élevées.

Ainsi, après deux mois de stockage, sous une humidité relative de 90 p. 100 les proportions de triglycérides passent de 85 p. 100 à 70 p. 100, 53 p. 100 et 48 p. 100 respectivement à 5—13 et 22°C.

Les diglycérides et les monoglycérides, par contre, ne varient pas de façon appréciable, il n'y a donc pas accumulation de glycérides partiels.

— *Quantités des acides gras libres totaux prépondérants.* La libération des acides gras (a. linoléique, a. oléique, a. stéarique, a. palmitique) et l'augmentation de l'indice d'acide sont d'autant plus rapides et plus importantes que l'humidité relative est plus élevée comme on peut le constater sur la fig. 1B qui illustre l'évolution de la quantité totale d'acides gras libres dans les lots stockés à 13°C sous 90—80 et 47 p.100 d'humidité relative. En trois mois elle est multipliée par plus de 100 sous 90 p. 100 d'humidité relative et par 30 environ sous 80 p.100 d'humidité relative alors qu'elle n'a pas encore varié de façon décelable sous 47 p.100 d'humidité relative.

De même, une élévation de la température entraîne une augmentation de la quantité libérée : en trois mois, sous une humidité relative de 90 p.100, elle est multipliée par 100 environ à 22°C, par 18 à 13°C et par 7 à 5°C.

Dans les zones hydriques et thermiques de multiplication des moisissures, la libération des acides gras est précédée par une augmentation des moisissures et elle se poursuit tandis que les moisissures sont en phase stationnaire. Mais l'augmentation des acides gras libres n'est pas nécessairement liée à un développement des moisissures ; ainsi, sous une humidité relative de 47 p.100, alors que les moisissures régressent lentement, les quantités d'acides gras libres doublent en 1,5 mois à 22°C, en 5 mois à 13°C, et en 9 mois à 5°C.

La fig. 1C illustre les variations des quantités d'acides gras libres totaux et de l'indice d'acide de l'huile des amandes stockées à 5—13 et 22°C sous une humidité relative de 80 p.100. En 2,5 mois l'indice d'acide est multiplié par 3 à 5°C, par 8,5 à 13°C et par 12,5 à 22°C.

Les variations de l'indice d'acide reflètent celles de la quantité d'acides gras libres et il existe une bonne corrélation entre elles.

— *Quantité de chacun des acides gras libres prépondérants.* La fig. 1D illustre l'évolution de chacun des principaux acides gras libres : au cours d'un stockage à 13°C sous une humidité relative de 90 p.100. L'acide linoléique (18 : 2) augmente plus vite que l'acide oléique (18 : 1), qui lui-même augmente plus vite que les acides stéariques (18 : 0) et palmitique (16 : 0) dont les courbes d'évolution sont sensiblement les mêmes. Après 5 mois de stockage, la quantité d'acide linoléique est multipliée par 68, la quantité d'acide oléique par 28 et les quantités d'acides stéarique et palmitique par 8 chacune. La fig. 2A illustre l'évolution à 13°C de la quantité d'acide linoléique sous les trois humidités relatives étudiées. En 8 mois, la quantité d'acide linoléique libérée est multipliée par 3, par 34 et par 90, respectivement sous les humidités relatives de 47, 80 et 90 p.100.

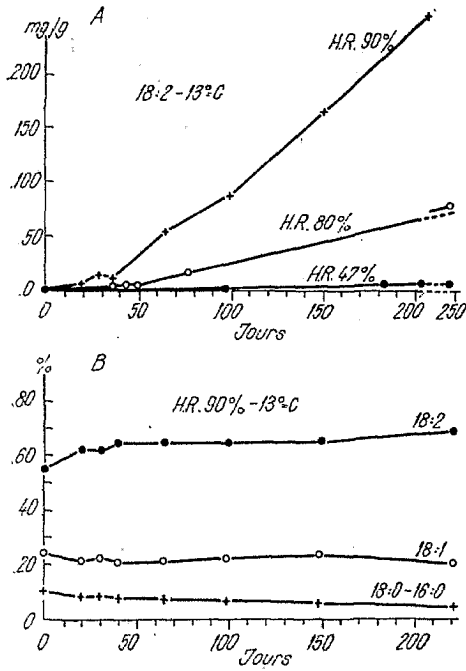


Fig. 2 — A Evolution de la quantité d'acide linoléique dans les amandes entières de tournesol stockées à 13°C en atmosphère libre sous une humidité relative de + 90 p. 100; ○ 80 p. 100; + 47 p. 100; abscisse: durée de stockage en jours; ordonnée: mg d'acide linoléique par gramme d'amandes sèches

B. Evolution des proportions des différents acides gras libres dans des amandes entières de tournesol stockées à 13°C sous une humidité relative de 90 p. 100; • acide linoléique; ○ acide oléique; + acides palmitique et stéarique

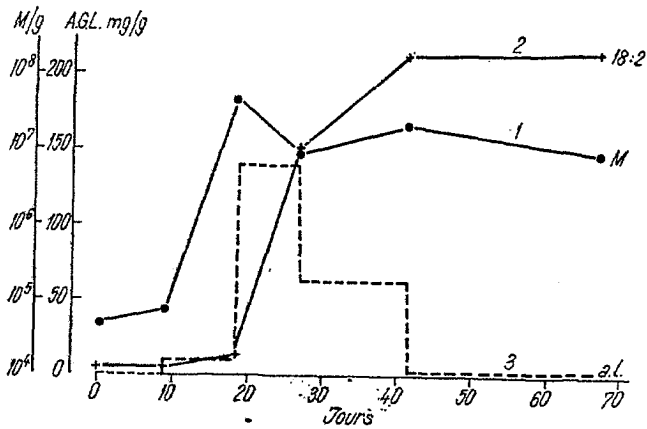


Fig. 3 — Evolution des *Penicillium* et de l'acide linoléique dans des amandes de tournesol broyées et débarrassées de leurs enzymes: (1) • *Penicillium*; (2) × acide linoléique; (3) --- quantité d'acide linoléique libérée entre chaque prélèvement; abscisse: durée de stockage en jours; ordonnée: nombre de germes de moisissures (*Penicillium*) par gramme d'amandes: quantité d'acide linoléique libérée exprimée en mg par gramme d'amande sèche.

— *Proportions des différents acides gras libres prépondérants.* La fig. 2B illustre l'évolution à 13°C, sous une humidité relative de 90 p.100 du pourcentage de chaque acide gras libre par rapport au total des acides gras libérés :

seule, la proportion d'acide linoléique augmente. Elle passe de 55 p.100 à 62 p.100 en 40 jours, puis de 62 à 69 p.100 en 7 mois environ. Avec un décalage de quelques jours, la phase d'augmentation rapide de la proportion d'acide linoléique correspond à celle des moisissures.

Corrélativement, les proportions des autres acides diminuent.

L'ampleur du phénomène est d'autant plus marquée qu'humidité et température sont plus élevées, mais il garde la même allure dans tous les cas, que les lots moisissent ou non et traduit une libération préférentielle d'acide linoléique.

2. ACTION DES MOISSURES SUR LES LIPIDES D'AMANDES BROYÉES PRIVÉES DE LEURS ENZYMES

Afin d'essayer de définir le mode d'action des lipases des moisissures, nous avons stocké, à 90 p.100 d'humidité relative, des amandes broyées privées de leurs systèmes enzymatiques etensemencées avec les deux espèces fongiques qui ont dominé au cours des essais antérieurs : *Penicillium brevi-compactum* et *Aspergillus repens*.

a) Evolution des moisissures.

A titre d'exemple, nous allons présenter les courbes d'évolution des lotsensemencés avec *Penicillium brevi-compactum*.

L'évolution des moisissures est illustrée par la courbe 1 de la fig. 3.

Les moisissures augmentent lentement pendant les 10 premiers jours de stockage, puis très rapidement entre le 10-ème et le 20-ème jour, et se stabilisent ensuite.

b) Evolution des glycérides et des acides gras libres — Glycérides.

Les proportions de triglycérides diminuent d'autant plus que les moisissures augmentent. Comme dans l'essai précédent, il n'y a pas de variations significatives ni des diglycérides ni des monoglycérides. Les lipases fongiques actives ne semblent donc pas avoir, ici non plus, de spécificité d'action vis à vis des positions internes ou externes des glycérides.

— Quantité de chacun des acides gras libres prépondérants.

Les quantités d'acides gras libres augmentent tout au long du stockage à des vitesses différentes suivant la phase de croissance des moisissures.

L'augmentation de la quantité d'acide linoléique se produit après celle des moisissures, elle est lente pendant les 20 premiers jours de stockage (la valeur de l'acide linoléique est multipliée par 5), puis très rapide pendant les 3 semaines suivantes (la valeur de l'acide linoléique est multipliée par 70) (fig. 3 — courbe 2).

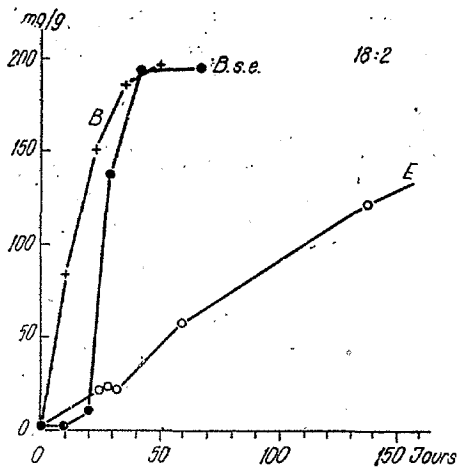


Fig. 4 — Evolution de la quantité d'acide linoléique à 22°C en atmosphère libre sous une humidité relative de 90 p. 100 dans: + des amandes broyées; . des amandes broyées dépourvues d'enzymes; O des amandes entières; abscisse: durée de stockage en jours; ordonnée: mg d'acide linoléique par gramme d'amandes sèches.

L'indice d'acide varie de la même façon.

Le diagramme 3 de la fig. 3 (en pointillé) représente la quantité d'acide linoléique libérée entre chaque prélèvement en fonction du temps.

C'est entre le 20-ème et le 30-ème jour de stockage que se trouve libérée la quantité maximale d'acide gras, c'est donc dans cette période que l'activité lipolytique des moisissures paraît être la plus intense. Le phénomène est identique pour les quatre acides gras libres prépondérants de l'huile de tournesol.

Il est à noter que la période de forte activité lipasique est postérieure à la période maximale de sporulation du *Penicillium*.

L'évolution des quantités d'acides gras libres est beaucoup plus rapide dans l'essai effectué avec des amandes broyées, privées d'enzymes (que nous venons d'examiner) que dans l'essai précédent effectué avec des amandes entières.

Cette différence provient sans doute de la destruction des structures cellulaires qui facilite le contact moisissures-nutriment. Par exemple (fig. 4), après 40 jours de stockage à 22°C sous une humidité relative de 90 p.100, la quantité d'acide linoléique est multipliée par 200 environ dans des lots d'amandes broyées (dépourvues ou non d'enzymes) et seulement par 30 dans les amandes entières.

— Proportion des principaux acides gras libres.

Tous les acides gras prépondérants de l'huile de l'amande sont libérés, mais l'acide linoléique est libéré plus rapidement, de sorte que la proportion d'acide linoléique augmente au cours du stockage et que les proportions des autres acides diminuent. Le phénomène observé est le même que dans les amandes entières, il est également la même dans le cas des lotsensemencés avec *Aspergillus repens*. Donc, en première approximation, le mode de dégradation de l'huile est le même dans le cas des amandes entières que dans celui des amandes broyées privées

d'enzymes stockées dans les mêmes conditions, sous une humidité relative de 90 p.100 et à 22°C.

Cette dégradation est due, au moins en partie, sinon en totalité, aux lipases des moisissures qui se développent au cours du stockage.

Ce qui revient à dire : ou qu'il n'y a pas de lipase active propre de l'amande dans les conditions expérimentales réalisées, ou que, s'il existe une lipase active dans l'amande, on ne peut distinguer son action de celle des lipases fongiques. Dans ce dernier cas deux éventualités sont à envisager : la lipase de la graine a un mode d'action identique à celui des lipases fongiques, la lipase de la graine agit différemment mais faiblement de sorte que son action est masquée.

3. ESSAI DE MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITÉ LIPOLYTIQUE PROPRE DE L'AMANDE

Des amandes entières décontaminées sont stockées dans les mêmes conditions que les amandes entières tout venant du premier essai (humidité relative 90 p.100, 22°C).

Pendant le stockage, alors qu'aucun développement de microorganismes n'est détecté, les quantités d'acides gras libres augmentent légèrement mais de façon significative. En 60 jours, la quantité d'acide linoléique est multipliée par 1,4, alors qu'elle est multipliée par 50 dans l'essai effectué avec des amandes entières non décontaminées.

Les variations observées sont peut-être dues à une faible activité lipasique de l'amande, mais l'hypothèse de l'action d'une lipase d'origine microbienne subsistant après la décontamination ne peut être écartée sans vérification.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

L'étude effectuée sur l'évolution microbiologique et biochimique d'amandes de tournesol décortiquées et stockées en atmosphère libre sous des humidités relatives de 47, 80 et 90 p.100, à 5°, 13° et 22°C, a permis de préciser ou de mettre en évidence un certain nombre de points :

Dans les conditions expérimentales réalisées, il n'y a pas multiplication de bactéries. La flore fongique susceptible de dégrader la matière grasse dans les amandes en se développant, est constituée en majorité de *Penicillium* à 90 p. 100 d'humidité relative et d'*Aspergillus* à 80 p.100 d'humidité relative.

Une augmentation importante de la quantité d'acides gras libres et de l'acidité grasse au cours du stockage des amandes est précédée par une multiplication rapide des moisissures, et se poursuit encore un certain temps après l'arrêt du développement des moisissures.

Mais une augmentation des acides gras libres, beaucoup plus lente et beaucoup plus faible, certes, se produit aussi dans les conditions de

stockage incompatibles avec un développement décelable des moisissures par la méthode utilisée.

Qu'il y ait ou non prolifération de moisissures :

— les proportions de diglycérides totaux et de monoglycérides ne varient pas sensiblement au cours du stockage, il ne semble donc pas y avoir de spécificité de position dans la libération des acides gras ; cette conclusion rejoint celle de Naudet (1968) ;

— l'augmentation des acides gras libres porte surtout sur l'acide linoléique ;

— les proportions de chaque acide gras (libre et combiné) par rapport aux acides gras totaux ne varient pas au cours du stockage.

L'action lipolytique des moisissures sur les amandes de tournesol, à l'exclusion de toute action propre de l'amande, présente les mêmes caractéristiques.

La très légère variation des quantités d'acides gras libérés dans des amandes décontaminées stockées sous une humidité relative de 90 p.100 à 22°C, laisserait supposer que dans ces conditions, l'amande n'a qu'une faible activité lipolytique propre et que les moisissures sont presque exclusivement à l'origine de la libération des acides gras dans les amandes qu'elles contaminent.

Pour préciser la nature des causes de la libération des acides gras au cours de stockages effectués sous de faibles humidités relatives, à l'abri de tout développement de microorganismes, nous nous proposons de suivre l'évolution des acides gras libres dans des broyats d'amandes germ-free, dans des amandes germ-free sèches et dans des amandes séchées après avoir subi une attaque fongique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Drapron, R., Sclafani, L., 1969, *Méthode de détermination de l'activité lipolytique des produits biologiques solides ou pâteux*, Ann. Technol. Agri., 18, 1, 5—16.
2. Mc Gee, D. C., Christensen, C. M., 1970, *Storage fungi and fatty acid in seeds held thirty days at moisture contents of fourteen and sixteen per cent*, Phytopathology, 60, 12, 1775—1777.
3. Guilbot, A., Poisson, J., 1966, *Evolution de la microflore des graines oléagineuses métropolitaines. Influence sur l'acidité de l'huile. Journée d'étude sur l'altération des graines oléagineuses ; moyens d'y remédier et conséquences*, 15 Mars, I.T.E.R.G. (5 Bd. de Latour Mauborg, 75007, Paris), 11—21.
4. Masson, C. G., Chanet, M., 1962, *Evolution dans le temps de quelques constituants du capitule et de la graine de tournesol*, Information technique de CETIOM, 2, 13—18.
5. Masson, C. G., 1963, *Etude comparative de la conservation du tournesol*, Oléagineux, 18, 10, 641—645.
6. Naudet, M., Biasini, S., 1968, *Sur l'acidification de l'huile au cours de la conservation des graines*, Rev. Franc. Corps Gras, 11, 657—662.
7. Poisson, J., Cahagniers, B., Chanet, M., Billaud, J., 1972, *5-ème conférence internationale sur le tournesol*, Clermont-Ferrand, 312—333.

8. Scherbakov, V. G., Devterov, G. C., 1968, *Modification de l'indice d'acide de l'huile de tournesol au cours du stockage et du traitement industriel des graines*, Maslozir, Prom. SSSR, 34, 3, 5—7.
9. Scherbakov, V. G., Silantiev, L. V., 1970, *Chromatographie en phase gazeuse des acides gras des graines de tournesol au cours de la maturation*, Izvest. vyssh. Ucheb. Zaved. piscev. Technol. SSSR, 5, 78, 26—29.
10. Zimmerman, D. C. et Fick, G. N., 1973, *Fatty acid composition of sunflower oil as influenced by seed position*, J. Am. Oil Chem. Soc., 50, 8, 273—275.