

Étude cinétique du rouissage traditionnel des racines de manioc en Afrique centrale (Congo)

Kinetic studies of cassava retting in Central Africa (Congo)

A. BRAUMAN *, **S. KÉLÉKÉ ***, **O. MAVOUNGOU****, **F. AMPE, ***
E. MIAMBI**

* *Laboratoire d'écologie microbienne, Centre Orstom, Brazzaville (congo)*

** *Laboratoire de biologie cellulaire, Faculté des Sciences Marien-N'gouabi,
Brazzaville (congo)*

- Résumé -

Le rouissage du manioc est une fermentation lactique spontanée, effectuée principalement en Afrique centrale. Le procédé consiste à immerger dans de l'eau des racines de manioc, entières ou prédécoupées, pendant trois à cinq jours. Cet article décrit l'évolution des principaux paramètres biologiques et physico-chimiques de cette fermentation.

La microflore du rouissage est constituée de bactéries fermentaires anaérobies facultatives, parmi lesquelles, après deux jours de fermentation, les bactéries lactiques deviennent majoritaires. Les levures (principalement *Candida spp.*) ne semblent pas jouer pas un rôle significatif dans le rouissage mais leur importance croissante dans les derniers stades du procédé pourrait influencer la conservation du produit final. Le pH de l'eau de rouissage se stabilise après 48h autour de 4.5, cette acidification est due à la production d'acides organiques, principalement le lactate, par les bactéries lactiques. La pression en oxygène dissous baisse très rapidement jusqu'à 0,2mg/l ce qui permet l'installation d'une microflore anaérobie stricte telle que les *clostridies*, qui produisent du butyrate. La microflore fermentaire utilise comme substrat carboné principal, les oligosaccharides (sucrose, glucose and fructose) de la racine. Au niveau de la racine, le rouissage se caractérise par trois transformations essentielles ; (i) une dégradation des composés cyanés endogènes de la racine (la concentration décroît de 400 ppm dans la racine fraîche à 20 ppm dans la racine rouie), (ii) une lyse importante des parois végétales due à l'action combinée de plusieurs pectinases (pectinemethyl-esterase et pectate lyase), (iii) la production d'acides organiques (C2 à C4), principalement du lactate et du butyrate qui participent au goût caractéristique des produits finaux : Chikwangue et Fufufu.

Ces résultats montrent que le rouissage est une fermentation hétérolactique complexe ou plusieurs flores bactériennes (bactéries lactiques, *Clostridies spp.*) et probablement *Bacillus spp* ou *Klebsellia spp* participent à la transformation des racines.

- Abstract -

Cassava retting is a spontaneous lactic acid fermentation carried out in Central Africa where whole or chopped cassava roots are soaked in water for 2 to 5 days. This paper describes the biological and physico-chemical changes occurring during the fermentation.

Most of the microflora involved in retting were facultative anaerobic bacteria, among which lactic acid bacteria were predominant after 2 days of retting. Yeast (mostly *Candida spp.*) played no significant role during retting but their increasing numbers at the end of the process might influence the preservation of the end products.

The pH of rett-water remained stable (~4.5) after 48 h which was due to the production of organic acids, mainly lactate, by lactic acid bacteria. The partial oxygen pressure dropped to 0.2 mg/l after 10 h. A typical anaerobic microflora (*Clostridia spp.*) was found during retting and was likely to be at the origin of butyrate production. The fermentative retting microflora utilized mainly the oligosaccharides (sucrose, glucose and fructose) in the roots as growth substrats.

At the roots level, retting can be characterized by three essential changes ; (i) degradation of endogenous cyanogens (levels decreased from 400 ppm in fresh cassava to 20 ppm in fermented mash), (ii) significant breakdown of cassava cell walls due to simultaneous action of different pectinases (methylesterase and pectate lyase); (iii) production of organic acids (C2 to C4) mainly lactate and butyrate which are involved in producing the typical flavour of the final products (Chikwangue and fufu).

From these results, retting could be seen as a typical but complexe heterolactic fermentation where different microflora (lactic acid bacteria, *Clostridia* and probably *Bacillus spp.* and/or *Klebsellia spp.*) are involved in the changes occurring in roots.

Introduction

Le rouissage, connu en occident et en asie dans le cadre du traitement de certaines malvacées comme le lin (Jauneau, 1985) et d'autres végétaux comme le concombre est utilisé en Afrique dans le cadre du prétraitement des racines de manioc (Ogunsa, 1980 ; Okafor *et al.*, 1984 ; Ayenor, 1985 ; Brauman *et al.*, 1994).

Le rouissage consiste à plonger les racines dans l'eau 3 à 4 jours ; durant cette fermentation, les glucosides cyanogénétiques endogènes (linamarine et lotaustraline) sont dégradés, les produits qui participent au goût du produit sont élaborés et les racines ramollies (Okafor *et al.*, 1984 ; Tinay *et al.*, 1984 ; Oyewole et Odunfa, 1990 ; Ampe *et al.*, 1994). En Afrique Centrale, ces racines rouies sont principalement transformées en fofou (farine de manioc) ou chikwangue (pain ou bâton de manioc ; Trèche et Massamba, 1989). Ces produits représentent ainsi près de 50% de l'apport calorique de la population en Afrique centrale (Massamba et Trèche, 1995). Malgré l'importance économique de ces produits dérivés, cette fermentation a été très peu étudiée. Les travaux précédents se sont surtout intéressés soit à la caractérisation des bactéries fermentaires (Okafor *et al.*, 1984, Oyewole et Odunfa, 1988,) ou aux enzymes du processus (Oyewole et Odunfa, 1992) soit à la mise au point d'inoculum (Oyewole et Odunfa, 1990). Oteng-Giang (1987) a entrepris une analyse cinétique de certains paramètres biochimiques mais cette étude demeure très partielle (pas de caractérisation des métabolites produits et sucres dégradés, ni des enzymes du processus). Ce travail représente une contribution à l'analyse globale du rouissage; dans ce but, l'évolution des principaux paramètres physiques, physico-chimiques, microbiologiques et biochimiques ont été suivis simultanément. Ce travail, grâce à la meilleure connaissance des mécanismes fermentaires, devrait permettre d'envisager la standardisation de l'étape rouissage, rendu nécessaire par l'urbanisation croissante des métropoles africaines et la concurrence importante des céréales importées.

Matériel et Méthodes

1. Origine du matériel végétal

Les racines de manioc (*Manihot esculenta* Grantz, variété Ngansa) récoltées après 18 mois de culture proviennent des plantations d'Agricongo du PK 45 au nord de Brazzaville.

2. Mode de rouissage et prélèvement des échantillons

Environ 100 kg de racines de manioc fraîchement récoltées, épluchées et lavées sont immergées dans un fût de 100 litres. Pour la mesure des paramètres

physiques et physico-chimiques (pH, pO₂, T°), un second fût sans racine est utilisé comme témoin. Chaque jour et de manière aléatoire, six racines sont prélevées, puis coupées en cubes d'environ 2 cm et prémélangées, avant d'être prélevées pour les diverses analyses biochimiques et microbiologiques.

3. Numération bactérienne

Pour chaque prise d'essai, 6 à 10 morceaux de racines sont prélevées au hasard et découpées en petits dés. 60 grammes de racines ainsi traités sont broyés dans 540 ml d'eau peptonée stérile à l'aide d'un Waring blender pour donner la première suspension dilution (10⁻¹).

Les numérations bactériennes sont effectuées après dilution en série de la suspension 10⁻¹. Les résultats du dénombrement des bactéries fermentaires totales et anaérobies strictes, proviennent de numérations statistiques effectuées en milieu liquide selon la technique du nombre le plus probable (Most Probable Number ; MacCrady, 1918), les autres groupes bactériens sont comptés par technique de numération classique sur milieu solide.

4. Milieu de culture

4.1. Bactéries lactiques (BL) et Bactéries aérobies totales (BMT)

- Gélose MRS (De Man *et al.*, 1960) à pH 5,5 à 6 pour les bactéries lactiques (culture à 30°C pendant 48-72 heures).

- Plate Count Agar (PCA) pour la flore aérobie totale (culture à 30°C pendant 48-72 h).

4.2 Bactéries fermentant le Glucose (BFG) ou le lactate (BAL)

Ces milieux sont préparés de manière anaérobie selon les techniques décrites par Hungate (1969) et modifiés par Macy (1972). La composition est décrite par Brauman *et al.* (1994).

4.3. Levures

Milieu Potatose Dextrose Agar (PDA, DIFCO laboratory) contenant 0,05g/l de chloramphenicol. Les isolats sont caractérisés au niveau du genre par les tests API (API 5030 strips Biomérieux France)

4.4. Clostridium

Le milieu de base est celui décrit par Widdel et Pfennig (1984), il contient par litre : Solution minérale de Widdel (20 fois concentré), 50 ml ; Solution d'oligo-éléments de Widdel, 1 ml ; Trypcase (Difco), 0,5g, extrait de levure (Difco) 0,5g ; Cysteine HCl, 0,5g ; Acétate de sodium, 1g ; Lactate de sodium (60%), 5g ; Rézazurine, 5mg.

Le milieu est bouilli et refroidi sous azote puis du NaHCO_3 10% (p/v) est rajouté (30 ml), le pH est alors vérifié et doit être compris entre 6,8 et 7,2. Le milieu est ensuite réparti en tubes de Hungate, stériles et dégazés sous N_2/CO_2 .

5. Paramètres physico-chimiques

5.1. Index de pénétrométrie

La pénétrométrie permet d'apprécier le ramollissement des racines de manioc au cours du rouissage ; le pénétromètre utilisé est de type PRN 10 Berlin. Le protocole utilisé est celui de Ampe *et al.* (1994). Un indice supérieur ou égal à 15 indique la fin du rouissage .

5.2. pH des racines et de l' eau de rouissage.

60g de racines broyées au Warring Blender sont homogénéisées dans 100 ml d'eau distillée, le broyat est filtré à l'aide du filtre GF / A (9 cm de diamètre). Le filtrat obtenu est complété à 200 ml avec de l' eau distillée pour la détermination du pH (pH mètre P307 Consort). Le même appareil est utilisé pour mesurer le pH de l'eau de rouissage (100 ml).

5.3. Pression d'oxygène dissoute (PO2)

L'oxygène dissous est déterminé à l'aide d'un oxymètre (type OX 91 de WTW, Germany) dans 50 ml d'eau de rouissage.

6. Paramètres biochimiques

6.1. Dosage des sucres et des acides organiques

20g de racines broyées à l'ultraturax en présence de 10 ml d'acide sulfurique 0,1N sont centrifugés (centrifugeuse Sorvall RC-5B à 10. 000 t/m pendant 10 mn).

Le surnageant est filtré sur membrane millipore (0,45 μm) et 20 μl de filtrat sont analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC Thermo Separation Product) sur un appareil muni d'une colonne Aminex d'échanges d'ions HPX - 87H pour les acides organiques ou HPX 42A pour les sucres (Biorad laboratoire Richmand, Calif.) et d'un détecteur de type réfractométrique (TSP Analytical). L'éluant utilisé est l'acide sulfurique 6mM avec un débit de 0,4ml /mn à 65°C .

6.2. Dosage enzymatique

- L'extraction des enzymes est réalisée selon le protocole décrit dans Ampe et Brauman (1994).
- L'activité β -glucosidase est déterminée par la capacité de l'extrait enzymatique à dégrader le substrat chromogène PNPG (P-nitrophenol- β -D-glucopyranoside). Le protocole suivi est décrit dans Ampe et Brauman (1994).

- La linamarase est mesurée selon la méthode décrite par Giraud *et al.* (1992).
- La pectinemethylesterase, la pectate lyase et la polygalacturonase sont mesurées selon la méthode décrite par Ampe et Brauman (1994).
- Les activités cellulase et xylanase ont été mesurées à 37°C et pH 5,8 (tampon Mc-Ilvaine) par la mesure des sucres réducteurs produits en présence d'extraits enzymatiques selon la technique de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945). Les substrats utilisés sont la cellulose microcristalline (100 mg/ml) et le xylane (18 mg/ml) .

6.3. Détermination de la concentration en composés cyanés

La linamarine, les cyanhydrines et les cyanures libres sont déterminés suivant la méthode de Cooke modifiée par Giraud *et al.* (1992).

Résultats

1- Aspects physico-chimiques du rouissage (figure 1)

Dès les premières heures du rouissage, on constate une baisse du pH et une diminution très rapide (~10h) de la pression d'oxygène dissoute qui se stabilisent respectivement, après le deuxième jour de la fermentation, autour de 4,5 et 0,05 mg/l (figure 1a).

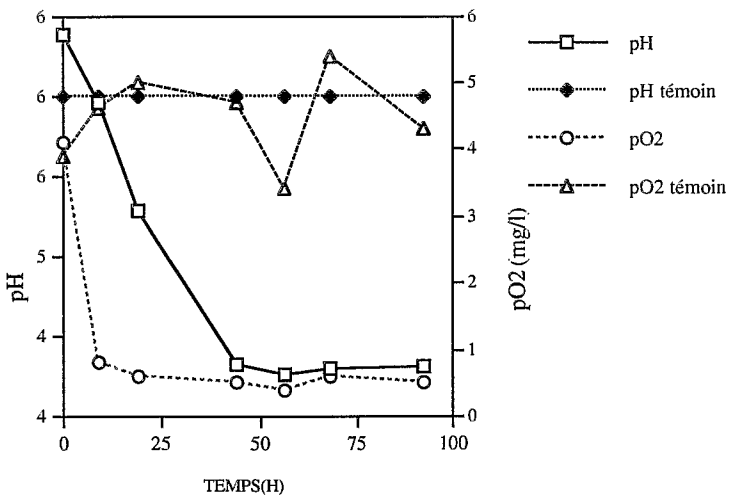


Figure 1a

Évolution du pH et de la pression d'oxygène dissoute au cours du rouissage

A partir du deuxième jour du rouissage, on constate une altération importante des cellules végétales (cf. Photo 1 à 4) qui se manifeste par un ramollissement important de la racine évalué par l'indice de pénétrométrie (Figure 1b). Les parois sont progressivement lysées et libèrent des grains d'amidons dans l'eau de rouissage, donnant au milieu de rouissage une couleur blanche caractéristique. Malgré l'altération des cellules végétales, la perte en matière sèche durant le processus est faible (moins de 20% cf. Figure 1b)

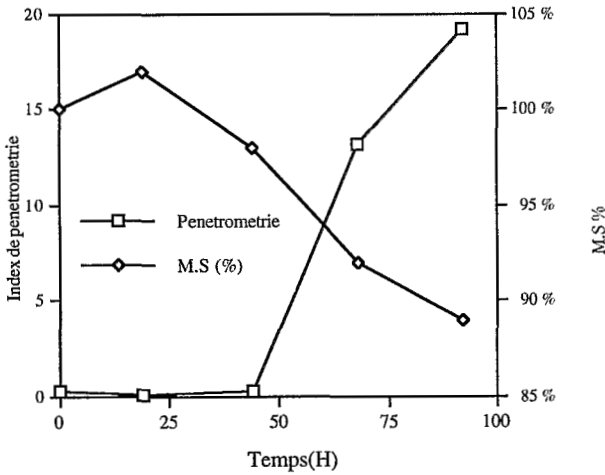


Figure1b

Évolution du degré de ramollissement et du poids frais des racines au cours du rouissage

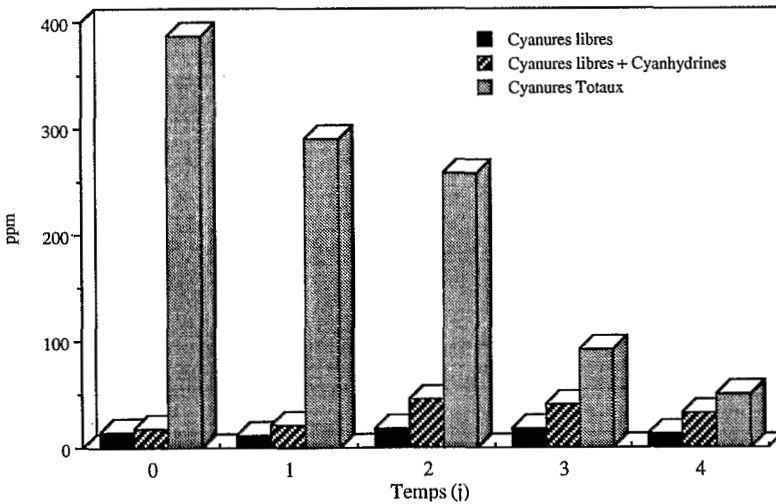


Figure 2

Évolution des teneurs en composés cyanés au cours du rouissage

NATURAL FERMENTATION OF CASSAVA ROOTS IN STANDING WATER

Coupe de racines de manioc entre le premier et le quatrième jour de la fermentation. Les cellules végétales sont colorées avec de la safranine.

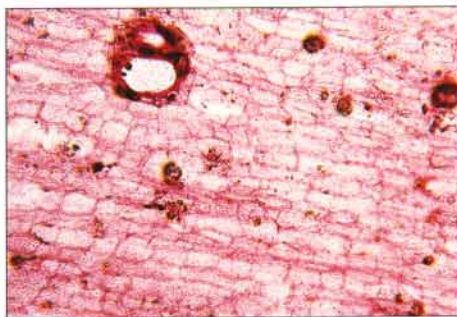


Photo 1
day 1 / premier jour
TO cellules entières

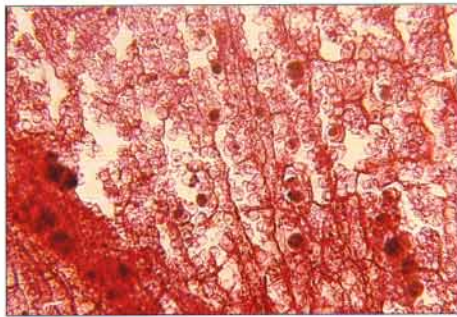


Photo 2
day 2 / second jour
T24h début de lyse des parois végétales

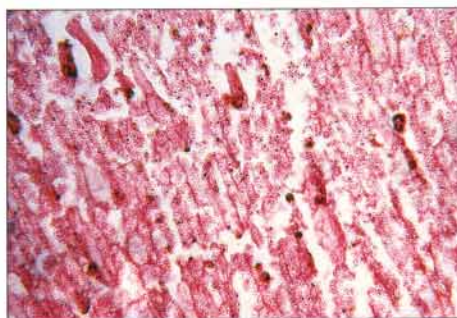


Photo 3
day 3 / troisième jour
T36h lyse partielle des cellules

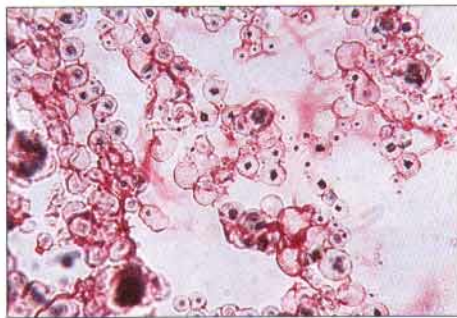


Photo 4
day 4 / quatrième jour
T72h lyse totale des cellules des racines
de manioc rouies

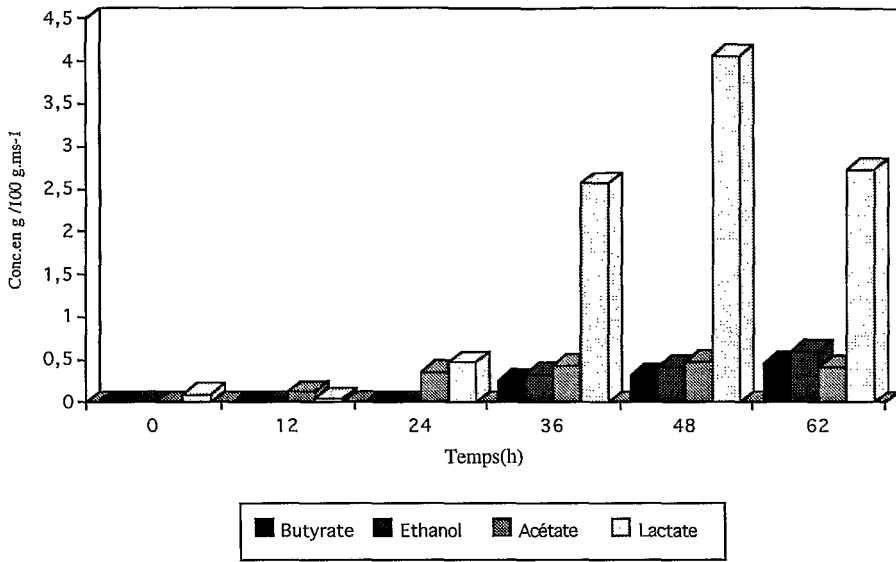


Figure 3a

Évolution de la concentration des principaux métabolites au cours du rouissage

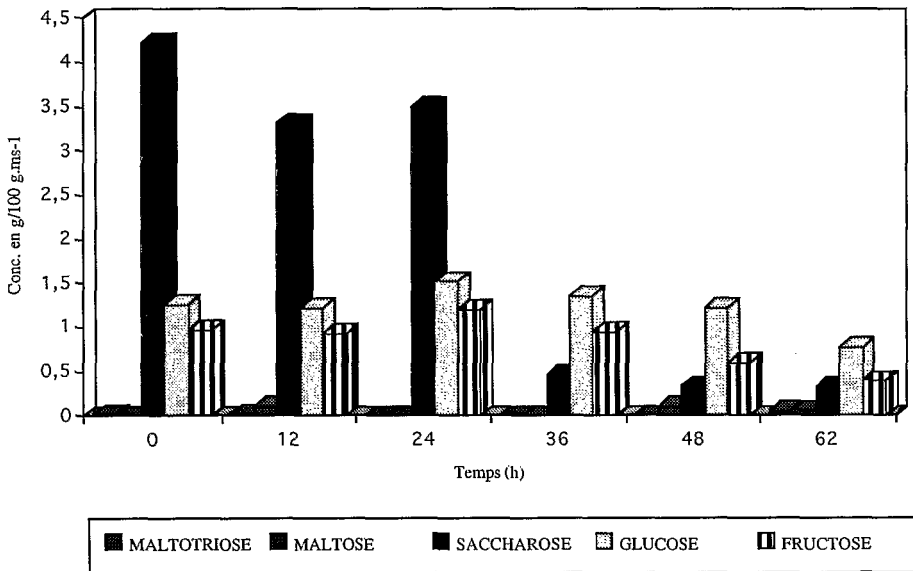


Figure 3b

Évolution de la concentration en oligosaccharides au cours du rouissage

2. Aspects biochimiques du rouissage.

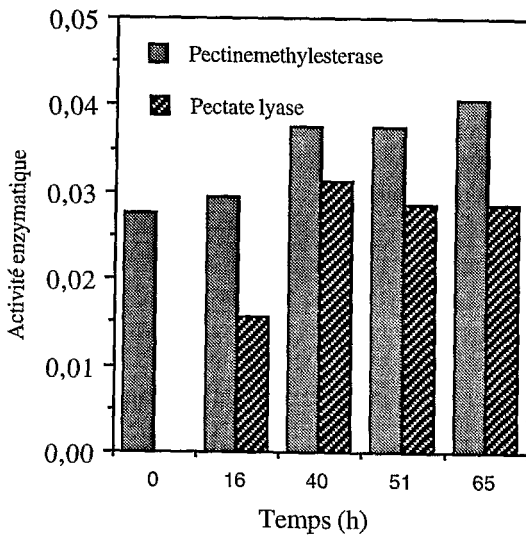
Le principal glucoside cyanogénétique des racines, la linamarine est pratiquement totalement dégradé après 4 jours d'immersion (Figure 2). On constate une baisse de la vitesse de dégradation à partir du deuxième jour de rouissage probablement due à l'acidité du milieu. Cependant, les teneurs résiduelles en cyanures libres en fin de fermentation dans la racine sont comprises entre 10 et 40 ppm (Figure 2).

Cette fermentation se caractérise par une production importante d'acides organiques, en majorité du lactate ($\sim 4,5\text{g}/100\text{g MS}$ soit 50 à 70 % des acides produits) de l'acétate et du butyrate ($\sim 2\text{g}/100\text{g MS}$) (Figure 3a) et de l'éthanol. Ces composés sont produits lors de la dégradation d'oligosaccharides (fructose, saccharose et glucose) (Figure 3b). On constate une faible concentration des sucres issus de l'hydrolyse de l'amidon, tels que le maltose et le maltotriose (Figure 3b).

Le rouissage est caractérisé par la présence d'un complexe de pectinases présent tout au long du processus. La pectinométhylesterase (PME, enzyme déméthoxylante) est déjà présente dans la racine non fermentée (figure 4). Son activité augmente progressivement jusqu'à la fin du processus fermentaire, ce qui pourrait être le signe de la présence d'une pectinestérase d'origine exogène (bactérienne ou fongique) qui apparaîtrait au cours du rouissage. Cependant, ce phénomène pourrait être dû également à une réponse cellulaire de la racine, engendrée par le stress que peut représenter le rouissage. L'activité pectate lyase apparaît, dès le premier jour de rouissage, elle atteint son maximum lors du deuxième jour de rouissage puis reste constante jusqu'à la fin de la fermentation (figure 4). On peut noter une bonne corrélation entre le début du phénomène de ramollissement et le maximum d'activité de la pectate lyase (figure 1b et figure 4). La polygalacturonase a une activité faible et ne semble pas jouer un rôle important dans ce processus. La linamarase, enzyme responsable de la détoxification de la racine est estimée par la mesure de l'activité β -glucosidase ; des études précédentes ayant montré une homologie de 65% entre l'activité β -glucosidase et l'activité linamarase (Mkpong *et al.*, 1990). La linamarase a une activité maximum dans la racine fraîche, puis celle-ci décroît tout au long du processus (figure 5).

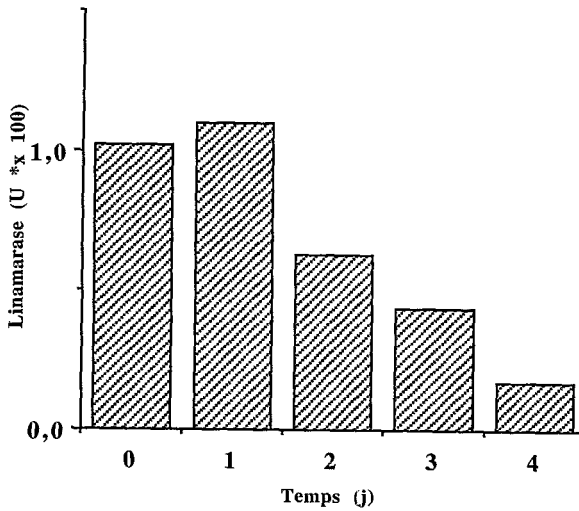
3. Aspects microbiologiques du rouissage.

A l'exception des levures, l'ensemble de la flore dénombrée évolue dans les premières 36h de rouissage (Tableau 1) puis se stabilise jusqu'à la fin du processus. La microflore est constituée de bactéries fermentaires anaérobies facultatives dont le nombre se situe entre 10^9 et 10^{12} cfu/g de manioc dès le deuxième jour du rouissage (Tableau 1); les bactéries lactiques constituent la majorité de ces bactéries fermentaires.



*L'activité pectate lyase est exprimée en
unité de D.O/mn/200 μ l d'échantillon
L'activité pectinmethylesterase est
exprimée en ml
NaOH (0,01M) /mn/200 μ l d'échantillon*

Figure 4
Évolution de l'activité pectinase au cours du rouissage



**Une unité enzymatique correspond à l'apparition d'une μ mole de CN- par mn
et par ml d'extrait enzymatique*

Figure 5
Évolution de l'activité linamarase au cours du rouissage

Tableau 1
Numération des bactéries fermentaires au cours du rouissage

Temps (h)	0	12	24	36	48	60	Post rouissage
BFG	4,65	nd	9,20	nd	12,20	12,2	13,20
BL	3,60	7,00	7,89	8,80	9,00	8,82	8,37
BMT	3,00	5,38	5,65	6,48	6,40	5,78	nd
LEV	<10	<10	0,55	nd	2,60	3,30	3,38/5,09
BAL	3,54	nd	3,48	nd	3,54	2,95	nd

Résultats exprimés en Log10 Nombres bactéries/g de poids frais de manioc

BFG : Bactéries fermentant le Glucose ; BL : Bactéries lactiques ; BAT : Bactéries aérobies facultatives totales ; LEV : levures ; BAL : bactéries anaérobies fermentant le lactate ; nd : non déterminé

La numération entreprise sur un milieu riche non sélectif (BMT sur Plate count Agar), montre la persistance d'une microflore aérobie ou anaérobie facultative comprenant des Entérobactéries type *Klebsellia spp.* Cette flore se stabilise autour de 10^6 bact /g de manioc ce qui représente 0,1 à 1% de la flore lactique et moins de 0,1%/₀₀ de la flore fermentaire totale.

Des bactéries anaérobies strictes ont été dénombrées sur lactate ; cette flore est difficile à dénombrer sur d'autres substrats comme les sucres car elles est alors supplantée par les bactéries lactiques. La présence de butyrate et la présence de batonnets sporulés dans les tubes de numération sont de bons indices de la présence d'une flore clostridienne. L'isolement d'un *clostridium* dont le phénotype est proche de *butyricum* a depuis confirmé cette hypothèse (E. Miambi, résultats non publiés). Cette flore semble être à l'origine du butyrate produit dans le milieu de rouissage (figure 3a).

Les levures apparaissent seulement après 48h de fermentation, leur nombre augmente lentement jusqu'à un maximum de 10^5 cfu/g en fin de rouissage.

Discussion et conclusion

1. Aspect physico chimique

Le rouissage décrit dans ce travail, se caractérise par une acidification progressive (pH 4,5 en 48h) du milieu comparable à celle mesurée par d'autres

auteurs pour la production de fufou (Okafor *et al.*, 1984 ; Oteng Gyang et Anuonye, 1987 ; Oyewole et Odunfa 1990). Dans le cas de la production de gari, l'acidification se produit plus rapidement dans les premières 24h (Ngaba et lee, 1979 ; Meraz *et al.*, 1992). Cette différence semble due au râpage préalable des racines (cas du Gari) avant la fermentation (Okafor, 1977) qui permet une libération plus rapide dans le jus des sucres fermentescibles, substrats des bactéries acidifiantes.

Une des autres principales caractéristiques de ce procédé est l'installation très rapide de conditions anaérobies (moins de 10h), due probablement à la consommation par la flore aérobie éphyphite de l'oxygène dissous dans l'eau de rouissage. L'instauration de conditions réductrices ($PO_2 < 0,1$ mg/l) est un paramètre important pour comprendre l'évolution microbiologique de cette fermentation, pourtant ce paramètre est souvent ignoré dans les études concernant les fermentations traditionnelles.

Le rouissage permet l'élimination de plus de 90% des composés cyanés endogènes de la racine. Cette disparition est essentiellement due à l'action de la linamarase endogène du manioc comme l'ont déjà montré de nombreux auteurs (Maduagwu, 1983), mais les bactéries qui grâce à leurs activités pectinasiques, peuvent lyser les cellules végétales, favorisent ce processus (Ampe et Brauman, 1994). La disparition de la linamarine durant le rouissage est plus lente que celle observée dans la fermentation du manioc pour la production de gari où elle est éliminée en moins de 5 heures (Giraud, 1993). Ce phénomène est également dû à l'absence de râpage préalable (cas du gari) ce qui ne permet pas une mise en contact direct de l'enzyme (linamarase), située dans les parois des cellules végétales, et de son substrat (linamarine), situé dans les vacuoles des cellules (Mkong *et al.*, 1990). Cependant l'abaissement plus progressif du pH permet par rapport au gari, une dissociation plus importante des cyanhydrines en cyanures libres, processus qui est inhibé à des pH inférieurs à 5,5 (Cooke, 1978). Les taux de cyanures libres totaux mesurés dans la racine rouie en fin de fermentation (10 à 40 ppm) sont comparables à ceux mesurés dans la fermentation pour la production de Miondo (Agbor-Egbe *et al.*, 1995) et de Gari (52 ppm HCN, Onyekwere et Akinrele, 1977, cités dans Steinkraus, 1988). Il sont encore supérieurs à la dose recommandée (10 mg kg⁻¹ PS, norme codex alimentaire 1989 ; Blanshard *et al.*, 1994). Cependant la racine rouie subit un ensemble de transformations ultérieures qui diminue encore la concentration en cyanures libres dans la chikwangue et le fufou (moyenne = 6 à 8 ppm ; Trèche *et al.*, 1995).

2. Aspects microbiologiques et biochimiques

Pour le transformateur, le principal intérêt du rouissage réside dans le ramollissement de la racine qui permet sa préparation ultérieure. Ce ramollissement est dû à la lyse de certaines parois des cellules végétales des racines, composées principalement de pectine et de cellulose. La présence d'activités pectinases importantes et l'absence d'activité cellulase indiquent que les premières sont à l'origine de ce ramollissement. Les pectinases détectées sont composées de trois enzymes (pectinesterase, pectate lyase et polygalacturonase) dont l'origine végétale et bactérienne a été depuis précisée (Ampe et Brauman, 1994). La présence de pectinestérase dans le rouissage a déjà été mentionnée dans le cas d'un rouissage traditionnel (Oyewole et Odunfa, 1990) ou de l'inoculation artificielle du manioc par des *Corynebacterium spp* (Okafor *et al.*, 1984). Le fait que le ramollissement débute le deuxième jour de rouissage dans des conditions acides et anoxiques indique que les bactéries, à l'origine de ce phénomène, sont anaérobies strictes ou facultatives et acido tolérantes. L'isolement récent de *clostridies* et *bacillus* pectinolytiques (Kéléke, résultats non publiés) corrobore cette hypothèse et contredit celle d'Okafor (1984) qui impute l'origine du ramollissement aux *Corynebacterium*. (non détecté dans notre travail). Le rouissage du manioc se caractérise donc, comme celui du lin (Morvan, 1985), par la dissociation des fibres de cellulose de leur ciment pectique due à l'action d'enzymes telles que les hydrolases et les lyases sur les liaisons osidiques des pectines.

Les bactéries lactiques constituent la flore dominante du rouissage (Oyewole et Odunfa, 1989), elles sont responsables des principaux acides organiques détectés au cours du rouissage ; acide lactique, acétique et éthanol qui entraînent l'acidification du milieu. La présence de lactate a des concentrations importantes (Lindgren et Dobrogosz, 1990) ainsi que l'acidité du milieu, expliquent la faible présence de bactéries pathogènes dans le produit roui (données non montrées); cependant la flore aérobie (ou anaérobie facultative) qui semble composée principalement des genres *Bacillus spp* et de *Klebsellia spp* ne semble pas entièrement éliminée par la flore lactique. Okafor (1984) mentionne également la présence des ces bactéries dans le rouissage mais indique qu'elles sont éliminées dès le troisième jour de rouissage. Les enterobactéries type coliformes se retrouve dans les produits finaux au niveau des marchés (Blanshard *et al.*, 1994) démontrant que les transformations post rouissage ou le stockage entraînent souvent une recontamination.

Les bactéries anaérobies strictes détectées sur lactate à 10^4 bactéries par gramme de manioc frais sont sûrement sous-estimées car le lactate ne semble pas constituer leur principal substrat de croissance. Un étude précédente (Trèche *et al.*,

1991) avait pu mesurer, le troisième jour du rouissage, jusqu'à 10^9 bactéries anaérobies. Cette flore semble responsable de la production de butyrate et dans une moindre mesure de propionate, produits caractéristiques des fermentations clostridiennes et qui participent à l'arôme caractéristique du produit final. La présence de clostridies (*Clostridium falcineum*) a déjà été mentionnée dans le rouissage du lin et du chanvre (Chesson, 1978) mais pas dans le cas du rouissage du manioc. Le butyrate comme l'éthanol semble caractéristique du rouissage car ces produits n'ont pas été détectés dans d'autres fermentations du manioc comme celle du gari (Akinrele *et al.*, 1975 citée dans Steinkraus, 1988).

Contrairement à ce qu'indiquent certains auteurs (Okafor ; 1984 ; Oyewole, 1990), les levures ne semblent pas représenter une flore importante du processus. Comme leurs métabolismes leur permet de croître au pH (3,5-4,5) imposé par les bactéries lactiques, elles représentent plutôt une flore caractéristique de la fin du rouissage. Ainsi, leurs rôles pourraient être importants dans le cas d'une conservation prolongée de la pâte rouie.

Les bactéries pectinolytiques, du fait de l'importance de la production de pectine lyase, représentent, à *priori* une flore déterminante dans ce processus ; mais leurs numérations, actuellement en cours, s'avèrent difficile à effectuer pour des raisons méthodologiques, cependant il semble que ces bactéries soient dominées par le genre *Bacillus* (dont *Bacillus polymixa*) et les *clostridies* (Kéléké, publication en cours).

Comme l'avaient déjà suggéré Oteng Gyang et Anuonye (1987), ce sont les mono et disaccharides (saccharose) qui constituent les substrats de la flore fermentaire. Les composés pectiques des parois cellulaires et leurs produits de dégradation (méthanol) pourraient servir de source alternative de carbone pour les bactéries, notamment les *clostridium*.

Le rouissage est donc une fermentation hétérolactique au cours de laquelle des activités microbiennes se combinent à l'action d'enzymes endogènes pour ramollir les racines et dégrader les composés cyanogénétiques. Le goût caractéristique du produit est en partie dû à la production d'acide lactique et d'acétate, produits par les bactéries lactiques, et de butyrate produit par les clostridies. L'influence des levures sur les qualités finales du produit mériterait d'être précisée.

Cette étude souligne l'importance écologique de tel biotope. En effet, face au risque de diminution du potentiel génétique bactérien dans les pays développés, dû à la standardisation des fermentations, l'étude de biotopes peu explorés comme les fermentations traditionnelles constitue une alternative intéressante pour l'isolement de nouvelles souches biotechnologiquement performantes.

Bibliographie

- AGBOR EGBE (T.), LAPE (M. I.), NOUBI (L.), TRECHE (S.), 1995 - « The effectiveness of cyanogen reduction during cassava processing into miondo ». In : AGBOR-EGBE (E.), BRAUMAN (A.), GRIFFON (D.) & TRECHE (S.), éd. : *Transformation Alimentaire du Manioc*, ORSTOM, Paris.
- AMPE (F.), BRAUMAN (A.), TRECHE (S.), AGOSSOU (A.), 1994 - The fermentation of cassava: optimization by the experimental research methodology. *J. of the Science of Food and Agriculture*, 65 : 355-361.
- AMPE (F.), BRAUMAN (A.), 1995 - Enzymatic origin of detoxification and root softening in cassava retting. *World. J. of Microbio. Biot.*, in press
- AYERNOR (G.S.), 1985 - Effects of the retting of cassava on product yield and cyanide detoxication. *Journal of Food Technology*, 20 : 89-96.
- BLANSHARD (A.F.J.), DAHNIY (A. M.T.), POULTER (H.N.), TAYLOR (A.J.), 1994 - Quality of cassava foods in Sierra Leone. *J.Sci. Food Agric.*, 64 : 425-432
- BRAUMAN (A.), KELEKE (S.), MALONGA (M.), AMPE (F.), 1995 - « Microbiological and biochemical aspects of cassava lactic fermentation in Central Africa ». In *International meeting on cassava flour and starch*, Cali, Columbia, CIAT Seminar, sous presse
- CHESSON (A.), 1978 - The maceration of linen flax under anaerobic conditions. *J. Appl. Bacteriol.*, 45 : 219-230
- CODEx ALIMENTARIUS COMMISSION, 1989 - In : Part C, Codex Régional Standards. Rome, Italie, FAO.
- COLLARD (P.), LEVI (S.), 1959 - A two-stage fermentation of cassava. *Nature*, 183 : 620-621
- COOKE (R.D.), BLAKE (G.G.), BATTERSHILL (J.M.), 1978 - Purification of cassava linamarase. *Phytochemistry*, 17:381-383
- DE MAN (J.C.), ROGOSA (M.), SHARPE (M.E.), 1960 - A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23 : 130.
- GIRAUD (E.), BRAUMAN (A.), KELEKE (S.), LELONG (B.), RAIMBAULT (M.), 1991 - Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus Plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36 : 379-383

GIRAUD (E.), GOSSELIN (L.), RAIMBAULT (M.), 1992 - Degradation of the cassava linamarin by lactic acid bacteria. *Biotech. letters*, 14 (7) : 593-598

GIRAUD (E.), 1993 - *Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de Lactobacillus plantarum amylolytique isolée du manioc fermenté*. Thèse Doct., Univ. Aix-Marseille II, 139 p.

HUNGATE (R. E.), 1969 - « A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes » . In Norris (J. R.), Ribbons (D. W.), éd. : *Methods in microbiology*, New York, Academic Press, vol 3 B : 117-132

JAUNEAU (A.), 1985 - *Contribution à la connaissance de la microflore pectinolytique ; application au rouissage du lin*. Thèse Doct., Fac. des sciences, Univ. de Rouen.

MC CRADY (M.H.), 1918 - Tables for rapid interpretation of fermentations tubes results. *Canad. Public health J.*, 9 : 201

MACY (J. M.), SNELLEN (J. E.), HUNGATE (R. E.), 1972 - Use of syringe methods for anaerobiosis. *Am. J. Clin. Nutri.*, 25 : 1318-1323.

MADUAGWU (E.N.), 1983.- Differential effects on the cyanogenic glycoside content of fermenting cassava root pulp by β -glucosidase and microbial activities. *Toxicology Letters*, 15 : 335-339

MASSAMBA (J), TRECHE (S.) 1995 - « La consommation de manioc au Congo » In : Agbor (E), Brauman (A), Griffon (D.), Trèche (S.), éd. : *Transformation alimentaire du manioc*, ORSTOM, Paris.

MERAZ (M.), SHIRAI (K.), LARRALDE (P.), REVAH (S.), 1992 - Studies of the bacterial acidification process of cassava (*Manihot esculenta*). *J. Sci. Food. Agric.*

MKPONG (O. E.), YAN (H.), CHISM (G.), SAYRE (R.T.), 1990 - Purification, characterization, and localisation of linamarase in cassava. *Plant Physiol.*, 93 : 176-181

MORVAN (C.) , MORVAN (O.), JAUNEAU (A.), DEMARTY (M.), 1985 - Capacité d'échanges cationique des fibre de lin. *C.R Académie Agric. de France*. 71 (8) : 837-841.

OKAFOR (N.), 1977 - Microorganisms associated with cassava fermentation for Garri production. *Journal of Applied Bacteriology*, 42 : 279-284

ONYEKWERE (O.O.), AKINRELE (I.A.), 1977 - «Nigerian Gari.» In : *Symposium of indegenous fermented foods*, Bankgok, Thailand.

OKAFOR (N.), IJIOMA (B.), OYOLU (C.), 1984 - Studies on the microbiology of cassava retting for foo-foo production. *J. Appl. Bacteriol.*, 56 : 1-13

OGUNSA (A.), 1980 - Changes in some chemical constituents during the fermentation of cassava roots (*Manihot esculenta*, Crantz). *Food Chem.* 5 : 249-255.

OYEWOLE (O.B.), ODUNFA (S.A.), 1988 - Microbiological studies on cassava fermentation for 'lafun' production. *Food Microbiology*, 5 : 125-133

OYEWOLE (O.B.), ODUNFA (S.A.), 1990 - Optimization of cassava fermentation for fufu production : effects of single starter cultures. *J. Appl. Bacteriol.*, 68 : 49-54

OYEWOLE (O.B.), ODUNFA (S.A.), 1992 - Extracellular enzyme activities during cassava fermentation for 'fufu' production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 8 : 71-72

OTENG-GYANG (K.O.), ANUONYE (C.C.), 1987 - Biochemiocals studies of the fermentation of cassava (*Manihot utilissima* Pohl). *Acta biotechnol.*, 3 : 280-292

SOMOGYI (M.), 1945 - Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.* 160 : 61-68

STEINKRAUS (K.H.), 1983 - «Acid fermented cereal gruels». In Steinkraus (K.H.), éd. : *Handbook of indigenous fermented foods*, microbiology series, vol 9, New York, Marcel Dekker, INC.

TRECHE (S.), MASSAMBA (J.), 1989 - « Transformations traditionnelles, formes de consommation et formes de commercialisation du manioc en milieu rural congolais». In: *Symp. of the International Society for Tropical Root Crops* - African Branch, Kinshasa, Zaïre, 4-9 December, sous presse

TRECHE (S.) 1995 - «Importance du manioc en alimentation humaine dans différentes régions du monde» . In : Agbor (E), Brauman (A), Griffon (D.), Trèche (S.), éd. : *Transformation Alimentaire du Manioc.*, ORSTOM, Paris.

TRECHE (S.), BRAUMAN (A.), FAVIER (R.), 1991 - «Etude et amélioration des modalités d'utilisation du manioc au Congo» In : *Séminaire de la recherche Francaise Agro Alimentaire Tropicale*, Nantes, Décembre 1991.

TRECHE (S.), MASSAMBA (J.), 1995 - «Les procédés traditionnels de transformation du manioc au Congo» .In : Agbor Egbe (E.), Brauman (A.), Griffon (D.), Trèche (S.), éd. : Transformation alimentaire du manioc. ORSTOM, Paris.

TINAY EL (A.H.), BURENG (P.L.), YAS, 1984 - Hydrocyanic levels in fermented cassava. *Journal of food technology*, 19 : 197-202

WIDDEL (F.), PFENNIG.(N.), 1984 - « Dissimilatory sulfate or sulfur-reducing bacteria ». In : Krieg (N. R.), Holt (J. G.), éd. : *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Baltimore, Williams & Wilkins, vol.1 : 663-679.