

Les moisissures toxigènes impliquées dans le ramollissement des racines tubéreuses du manioc en fermentation sèche

Toxigenic molds involved in the softening of cassava roots during low-moisture fermentation

D.L. YANDJU *, K.L. MATONDO, B. MUNYANGANIZI**

** Faculté des Sciences de l'Université de Kisangani, Laboratoire de Biotechnologie, Kisangani (Zaire)*

*** Institut Facultaire Agronomique de Yangambi, Kisangani (Zaire)*

- Résumé -

Ce travail concerne la cinétique d'apparition des aflatoxines produites par des espèces toxigènes d'*Aspergillus*. En effet, ces espèces sont très importantes dans le processus de ramollissement du manioc par fermentation sèche. Cette étude se propose de préciser la cinétique de production des aflatoxines par les souches d'*Aspergillus*.

Cette étude a révélé que la production des aflatoxines intervient vers le 3ème jour pour l'espèce *A. flavus* (LINK) suivi de *A. flavus oryzae*, *A. niger*, *A. fumigatus* et *A. glaucus chevalieri*.

Cette production des aflatoxines au cours du ramollissement du manioc présente un danger permanent dans la consommation du manioc fermenté par voie sèche. Ainsi donc, l'amélioration de la technologie traditionnelle du manioc doit surtout viser la sélection d'espèces ne produisant pas d'aflatoxines et qui soient efficaces du point de vue technologique.

- Abstract -

This report is on the rate of aflatoxin production by toxigenic strains of different *Aspergillus* species. As a matter of fact, these mold species have an important role in cassava softening during low-moisture fermentation.

This study has shown that aflatoxins are produced towards the third day of fermentation by *A. flavus oryzae* followed by *A. niger*, *A. fumigatus* and *A. glaucus chevalieri*.

The production of aflatoxins during the softening of roots is a permanent danger to the consumer of low-moisture fermented cassava-based foods. Improvement of traditional cassava fermentation must therefore, be directed towards selection of non-producing aflatoxin species which are at the same time efficient in the softening process.

Introduction

Les racines tubéreuses de manioc peuvent, moyennant un certain degré d'humidité, subir une fermentation sèche ou fermentation à l'air libre. Ce procédé de fermentation du manioc est pratiqué couramment dans les régions du Nord-Kivu, du Sud-Kivu, de l'Ituri et dans les pays limitrophes, à l'est du Zaïre. Cette fermentation aboutit à la réduction du taux de cyanures des cossettes et à l'élaboration des propriétés organoleptiques de la farine et d'autres pâtes (*Fufu*) produites de cette manière.

L'importance des moisissures dans le processus de fermentation a été établie (Yandju, 1989). Les espèces *Mucor muceolo*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* LINK, *A. niger*, *A. amstelodami*, *A. fumigatus*, *A. flavipes* et *A. Sparsus* ramollissent les tubercules ce qui peut entraîner dans certains cas la séparation de l'amidon des fibres.

Cependant, la production d'aflatoxines par certaines espèces, comme *A. flavus* LINK, *A. niger* et *A. fumigatus* a été confirmée (Moreau, 1974 ; Masimango, 1978 ; Mongi, 1979 ; Cock et Wheatley, 1984). Une relation entre la consommation d'aliments souillés par ces moisissures et le développement de cancer de foie a été établie (Shank *et al.*, 1972 ; Lovelace *et al.*, 1989).

La présente étude a cherché à déterminer le moment où des aflatoxines sont produits chez quelques espèces d'*Aspergillus* lors de la fermentation sèche des racines tubéreuses du manioc.

Matériel et méthodes

1. Préparation du matériel biologique

Des racines de manioc frais (7 à 9 mois) épluchées et nettoyées sont sectionnés en "cossettes" de 15 cm de longueur. A l'aide d'un marqueur noir, des limites concentriques de 0,5 à 1 cm de distance sont tracées pour obtenir les échantillons à analyser. Après désinfection à l'alcool éthylique à 70 %, des souches pures d'*Aspergillus* sont inoculées par étalement à la surface des tubercules.

Les racines ainsi traitées sont recouvertes de feuilles de bananier désinfectées, et sont placées dans des conditions de fermentation sèche. Les tests de détection des aflatoxines sont effectués toutes les 24 heures jusqu'au ramollissement complet des racines.

L'extraction des aflatoxines se fait au chloroforme (Moreau, 1974) ; la détection des aflatoxines est réalisée par méthode chimique ainsi que par méthode biologique (Moreau, 1974).

La détection chimique consiste en la réduction du nitrate de potassium ou nitrate d'argent ammoniacal en nitrite. 2 ml d'extrait de l'échantillon de manioc fermenté sont placés dans un petit tube ; on ajoute 1 ml de nitrate d'argent et on y mélange successivement 3 à 6 gouttes des réactifs de Griess 1 et 2.

La présence des aflatoxines dans l'extrait se traduit par l'apparition d'une coloration rose ou rouge. En cas de réaction négative, on ajoute quelques cristaux de zinc. Si l'extrait reste incolore, c'est que la réduction est allée jusqu'au stade de l'azote moléculaire.

Pour la détection biologique, notre choix a porté sur l'inhibition de la croissance bactérienne par les aflatoxines (Moreau, 1974 ; Auril, 1977). Une préculture de la souche *Escherichia coli* C₆₀₀ (Collection Université Libre de Bruxelles) est placée dans 5 ml de bouillon nutritif après étuvage à 44 °C pendant 2 à 5 heures. Des dilutions décimales successives de cette culture sont effectuées et étalées respectivement à l'aide d'un écouvillon à la surface de la gélose nutritive. Après quelques minutes de séchage à la température ambiante, des disques stériles (de 5 mm de diamètre) préalablement imbibés de l'extrait chloroformique sont, après évaporation du solvant, déposés aseptiquement sur la gélose.

La lecture des résultats intervient après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C. Elle est effectuée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition au moyen d'une latte graduée. L'inhibition de la croissance de *E. coli* C₆₀₀ signifie qu'il y a présence d'aflatoxines dans l'extrait.

Résultats et discussions

Les prélèvements des échantillons effectués au cours du temps d'expérimentation nous ont permis de constater que la production des aflatoxines commence pendant la fermentation. Le taux d'aflatoxines exprimé en diamètre des zones d'inhibition par le temps est représenté dans la figure 1.

Ces résultats sont révélateurs de la production d'aflatoxines par les espèces *A. flavus* LINK, *A. flavus oryzae*, *A. niger*, *A. glaucus chevalieri* lors de la fermentation sèche du manioc.

Cette production débute 48 heures après incubation pour l'espèce *A. flavus* LINK, alors que pour les autres espèces, elle a lieu après le 3^e jour.

L'étude des échantillons prélevés d'abord par raclage du manioc fermenté, puis à 0,5 cm de la surface, puis vers 1 cm du milieu et au centre de la rondelle a montré que la diffusion des aflatoxines suit le ramollissement. Elle commence à la surface puis, progressivement, si le processus n'est pas arrêté à temps par séchage, les aflatoxines atteignent le centre des racines.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition bactériennes produites par la présence d'aflatoxines révèle une forte production par *A. flavus* LINK (1,2 cm au 4^e

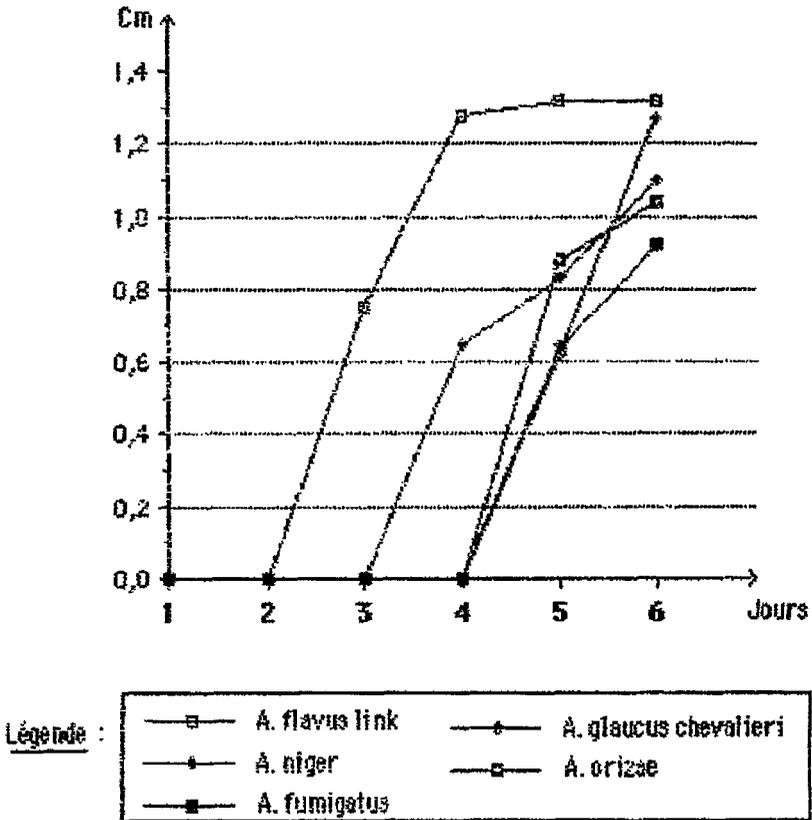


Figure 1

Taux de production des aflatoxines par différentes espèces d'Aspergillus (diamètre en cm/jour)

jour, alors que le diamètre correspondant pour *A. niger* est de 0,8 cm). La production la plus faible a été relevée pour *A. glaucus chevalieri* (0,9 cm au 6^e jour).

Dans la fermentation sèche traditionnelle, le ramollissement du manioc s'obtient entre le 3^e et le 4^e jour. C'est pratiquement dans le même intervalle de temps que commence la production des aflatoxines.

Ce résultat révèle le danger que présente pour l'homme le ramollissement du manioc par les espèces étudiées. Ce danger est d'autant plus important que dans la technologie traditionnelle, ignorante des microorganismes impliqués, la durée de fermentation n'est pas limitée.

En effet, le séchage, qui commence au 4^e jour, se fait au soleil à l'air libre : ce qui ne permet pas d'interrompre rapidement la fermentation.

Conclusion

Parmi les moisissures responsables du ramollissement du manioc par fermentation sèche, les espèces *A. flavus* (LINK), *A. niger*, *A. flavus oryzae*, *A. glaucus chevalieri* et *A. fumigatus* produisent des aflatoxines. Cette production débute vers le 3^e jour et se poursuit jusqu'au 6^e si le processus n'est pas arrêté à temps par séchage.

Alors que dans le cas d'autres plantes alimentaires (riz, maïs, arachide, etc.) la production d'aflatoxines a lieu pendant le séchage, dans le cas du manioc elle se produit pendant la fermentation.

L'amélioration de la technologie traditionnelle du manioc doit viser surtout à la sélection de souches microbiennes responsables du ramollissement et de la détoxification et qui soient en même temps inoffensives pour les consommateurs.

Bibliographie

BIOMERIEUX, 1977 - Additif au manuel - Bactériologie, virologie - culture cellulaire.

COCK (J.H.), WHEATLEY (C.), 1984 - Aflatoxin in cassava... - is it a real problem? *Cassava Newsletter*, 8 (2) : 14.

COCK (J.H.), WHEATLEY (C.), MARCY, 1984 - L'Etoile 69260 Charbonnière

LOVELACE (C.E.A.), AALBERSBERG (W.G.L.), 1989 - Aflatoxin levels in foodstuff in Fiji and Tonga Islands Plant, *Foods for Human Nutrition*, 39(4) : 393-399.

LOVELACE (C.E.A.), AALBERSBERG (W.G.L.), 1989 - Les bains, France 19 p.

MARCHAL (N.), BOURDON (J.L.), 1973 - *Milieu de culture et identification biochimique des bactéries*. France, DOIN p. 179.

MASIMANGO (N.), RAMAUT (J.L.), REMACLE (J.), 1978 - Aflatoxine et champignons toxigènes dans des denrées alimentaires zaïroises. *Fermentation et industries alimentaires*. Bruxelles, 32(6) : 165-170.

MONGI (J.), 1979 - Les moisissures et leurs toxines. *La Recherche*, 102 : 732-742.

MOREAU (Cl.), 1974 - *Moisissures toxiques dans l'alimentation*. 2e éd. Paris, Masson et Cie, p. 263.

SHANK (R.C.), WOGAN (G.N.), GIBSON (J.B.), 1972 - Dietary aflatoxins and human liver cancer. Toxigenic moulds in foods and foodstuffs of tropical South East Africa, *Food and cosmetics Toxicology*. 10(1) : 51-60

YANDJU (D.L.), 1989 - *L'importance des moisissures dans le ramollissement du manioc en fermentation sèche*. Mémoire de D.E.S. Fac. Sc. UNIKIS, Kisangani, Zaïre.