

ORSTOM

INSTITUT FRANCAIS DE LA RECHERCHE SCIENTIFI-
QUE POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION

213, rue Lafayette - 75480 PARIS CEDEX 10

LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIE-PMC

"Physiologie et Métabolisme Cellulaire"

2051, Av. Val de Montferrand

34032 MONTPELLIER

Maurice RAIMBAULT, Serge TRECHE, Alain BRAUMAN, Eric GIRAUD, Michel JORY

AMELIORATION DES MECANISMES DE DETOXICATION
DU MANIOC LORS DES PHASES DE FERMENTATION

Compte-rendu de fin d'étude d'une
recherche financée par le Minis-
tère de la Recherche et de la
Technologie

Date:.....Novembre 1990

Décision d'aide N°:.....88.L.0215

-RESUME SIGNALÉTIQUE-

(Venant en seconde page, son contenu d'une dizaine de lignes expose succinctement le thème et les résultats de la recherche, éventuellement l'originalité du protocole expérimental. Termes, concepts et mots clés utilisés renforcent l'information contenue dans le titre général du compte-rendu).

Amélioration des mécanismes de détoxification du manioc lors des phases de fermentation.

Les études sur *Brevibacterium* ont porté essentiellement sur la recherche de vecteur de clonage pour le transfert des gènes de la nitrilase dans une bactérie lactique. Par ailleurs un prototype de **fermenteur** permettant le contrôle du pH du jus de drainage et sa recirculation a été réalisé en vue de la mise au point d'un procédé permettant d'améliorer l'élimination des **cyanures**.

Les études menées au Congo ont permis de mieux caractériser les différentes phases du **rouissage** du manioc (immergé ou à sec), de suivre l'évolution de la composition des tubercules, l'élimination des cyanures, et l'apparition d'acides gras volatiles. Des bilans détaillés ont été établis et des études d'acceptabilité et de **qualités organoleptiques** des produits ont été réalisées. Le rouissage immergé semble plus efficace, mais un rouissage contrôlé à sec peut également être envisagé.

Le suivi de la microflore lors du rouissage du manioc a conduit à démontrer le caractère hétérolactique de la fermentation, alors qu'elle est essentiellement homolactique dans le cas de la fermentation de la pulpe de manioc (gari, amidon aigre). Des **souches lactiques** nouvelles ont été isolées à partir de manioc roui, dont un *Lactobacillus plantarum* (A6) fortement **amylolytique**, et un *Streptococcus pectinolytique*.

On a mis en évidence la résistance de **bactéries lactiques** à des concentrations élevées de cyanures, et démontré que certaines souches lactiques sont capables de dégrader la **linamarine** en **acide lactique**.

FICHE SIGNALÉTIQUE ADMINISTRATIVE

Numéro de la décision d'aide:88.L.0215

Objet de la décision:.....Amélioration des mécanismes de détoxification du manioc lors des phases de fermentation.

Nom du responsable scientifique:.....Maurice RAIMBAULT

Téléphone:..... 67 61 75 83

Adresse du Laboratoire:.....Laboratoire de Biotechnologie - P.M.C.
2051, Av. Val de Montferrand
B.P.: 5045 - 34032 MONTPELLIER

Objectifs visés à l'origine:.... Programme articulé autour de deux démarches complémentaires et transférables d'une filière de transformation du manioc à une autre (gari et fufou):

- Détoxification par voie biologique par utilisation d'une souche de *Brevibacterium* R312, possédant des systèmes enzymatiques présentant des potentialités intéressantes de détoxification vis à vis des différentes formes de cyanures présentes.

- Etude du rôle des bactéries lactiques présentes dans différentes techniques de rouissage et de leur influence sur la valeur nutritionnelle d'aliments traditionnels dérivés du manioc.

Ces objectifs ont-ils été atteints? Sinon, pourquoi?: OUI en grande partie

D'autres objectifs que ceux visés à l'origine ont-ils été atteints? lesquels?:

Plusieurs souches nouvelles de bactéries lactiques ont été isolées et sont actuellement étudiées.

Le compte-rendu a-t-il un caractère confidentiel?:....NON

Si oui, pendant combien de temps?:

Des brevets ont-ils été pris à l'occasion de la recherche?:.....NON

Conclusion générale sur la recherche:

Les études sur *Brevibacterium* ont porté d'abord sur la culture sur milieu manioc, puis dans l'optique de transférer des gènes de cette bactérie dans une bactérie lactique qui pourrait mieux s'exprimer dans ce type de fermentation.

Les études sur le rouissage ont montré le rôle capital des bactéries lactiques sur le développement du procédé et l'influence des activités enzymatiques particulières développées par ce groupe de bactéries (amylases, pectinases).

Il est apparu que les bactéries lactiques jouent un rôle déterminant dans les fermentations à base de manioc et qu'elles peuvent prendre part directement et indirectement à la biodégradation des composés cyanés présents dans le manioc.

Les études sont actuellement poursuivies dans le cadre d'un programme européen de collaboration avec des pays d'Afrique et d'Amérique Latine.

FICHE BIBLIOGRAPHIQUE

(Nous vous prions de bien vouloir remplir la fiche bibliographique ci-jointe selon modèle présenté (texte à dactylographier). Cette fiche doit permettre au centre de Documentation du Ministère de la Recherche et de la Technologie, d'enregistrer votre rapport de fin d'étude dès sa réception.)

Numéro de la décision d'aide:..... 88.L.0215

Objet de la décision:..... "Amélioration des mécanismes de détoxification du manioc lors des phases de fermentation"

Auteurs:...Maurice RAIMBAULT, Serge TRECHE, Alain BRAUMAN,
Eric GIRAUD et Michel JORY

Titre:..... Amélioration des mécanismes de détoxification du
manioc lors des phases de fermentation

Organisme bénéficiaire:..... ORSTOM

Laboratoire de Physiologie et Métabolisme Cellulaires,
34032 MONTPELLIER

Date de la rédaction du Compte-rendu

de fin d'étude:..... Novembre 1990

-TABLE DES MATIERES-

I. INTRODUCTION.

II. RAPPEL DES OBJECTIFS

III. DEROULEMENT DU PROGRAMME

IV. RESULTATS des TRAVAUX

Opération n° 1. Détoxification du gari – M. JORY, (CEEMAT/ENSAM)

a). Potentialité d'utilisation de Brevibacterium R312

b). Fermentation de la pulpe de manioc en fermenteur pilote

Opération n° 2. Etude des mécanismes de rouissage sur la l'acidification, la détoxification et l'acceptabilité du fofou et de la chicouangue – S. TRECHE, (ORSTOM-Brazzaville)

Opération n° 3. Etude physiologique des bactéries lactiques, mise en évidence de leur rôle dans le rouissage – M. RAIMBAULT, (ORSTOM-Montpellier)

V. CONCLUSIONS GENERALES

VI. RESUME

I.- INTRODUCTION

La culture du manioc s'est répandue dans la plupart des pays en voie de développement de la zone tropicale d'Afrique, d'Amérique et d'Asie, où elle s'accommode de conditions climatiques difficiles et de sols médiocres. En Afrique, la quasi totalité des quelques 45 millions de tonnes produits annuellement sont réservées à l'alimentation humaine et constituent la principale source d'énergie alimentaire pour près de 300 millions de personnes; dans certaines régions, la consommation de manioc peut couvrir en moyenne, plus de 75% des besoins énergétiques des individus.

Néanmoins, le manioc présente les deux particularités suivantes :

- une certaine toxicité, liée à la présence de composés cyanogénétiques dans la racine,
- un caractère hautement périssable des racines, compensé en partie par une large tolérance dans le choix de la date de récolte, le manioc n'ayant aucune période d'inactivité et les racines pouvant commencer à se détériorer dès la récolte.

Cette toxicité est liée au caractère cyanogénétique du manioc, propriété rencontrée très fréquemment dans le monde végétal comme animal, qui conduit à émettre sous certaines conditions de l'acide cyanhydrique.

Dans les tissus végétaux, l'acide cyanhydrique ne se trouve pas à l'état libre mais sous forme de composés chimiques qui sont le plus souvent des glycosides cyanogénétiques et plus rarement des cyanolipides, tous deux étant des dérivés d'alpha-hydroxynitriles. Ces glycosides sont susceptibles de se décomposer par hydrolyse pour donner un sucre, une cétone et de l'acide cyanhydrique.

Le principal mécanisme de dégradation des composés cyanogénétiques dans le cas des différentes transformations du manioc consiste en une voie enzymatique qui se déroule en deux étapes :

- hydrolyse des glucosides sous l'action d'une enzyme endogène, la linamarase, avec formation d'une cyanohydrine et libération d'un glucose. Cette hydrolyse enzymatique se retrouve chez l'ensemble des plantes cyanogènes, les composés cyanogénétiques se trouvant localisés dans les vacuoles des cellules tandis que les enzymes hydrolytiques sont principalement dans les membranes des cellules. La linamarase est spécifique de la linamarine mais aussi de la lotaustraline. Elle a son optimum d'activité à pH 5,5-6 et a une température de 37°C ; elle est relativement stable jusqu'à 72°C.
- dissociation de la cyanohydrine en acide cyanhydrique et en cétone ; cette dissociation peut être chimique, mais il a été suggéré la présence d'une seconde enzyme, une hydroxynitrilyase, par analogie avec les mécanismes mis en évidence pour la durhine du sorgho. La stabilité de la cyanohydrine à différents pH montre qu'elle est relativement stable en milieu acide, l'équilibre entre la cyanohydrine et l'acide cyanhydrique s'instaurant pour un pH voisin de 5,5.

D'autres voies de dégradation des glucosides ont été évoquées : dégradation spontanée en milieu acide dilué correspondant au manioc en cours de fermentation, intervention de systèmes enzymatiques produits par des micro-organismes. Leur importance reste secondaire par rapport à la voie enzymatique mais ces voies méritent néanmoins d'être prises en compte dans une réflexion générale sur les mécanismes de dégradation des composés cyanogénétiques.

la détoxification du manioc dans ses usages alimentaires s'effectue donc selon les principes suivants :

- élimination directe des composés cyanogénétiques par dissolution dans l'eau,
- décomposition des composés cyanogénétiques suivie de l'élimination de l'acide cyanhydrique formé par évaporation ou lavage (HCN est volatile à partir de 27°C et est très soluble dans l'eau).

Les populations autochtones ont su développer toute une série de traitement technologiques, dont la conséquence principale est de permettre la détoxification du manioc et qui conduisent à l'élaboration de nombreux produits traditionnels présentant une spécificité régionale. Compte-tenu de l'inaptitude des étapes de séchage et de cuisson à éliminer entièrement les composés cyanés du manioc, la plupart des transformations alimentaires traditionnelles comportent une phase au cours de laquelle se déroulent simultanément des fermentations, la décompositions des cyanoglucosides et l'élimination des cyanures libérés.

Cette phase de fermentation peut s'effectuer sur de la pulpe de racines comme dans le cas de la préparation du gari ou de l'attiéké ou sur des racines entières : ce dernier procédé, connu sous le terme de rouissage, consiste à immerger les racines dans de l'eau. Dans les deux cas, cette phase dure de deux à six jours et doit être suivie immédiatement par les étapes ultérieures de transformation, sans possibilité de stockage. Plusieurs catégories de microorganismes interviennent, la plupart des auteurs s'accordant à reconnaître le rôle important des bactéries lactiques. La fermentation est à l'origine des arômes caractéristiques et de la modification de la texture des produits par la complexation de l'amylose avec des molécules d'acides gras saturés. De plus, dans le cas du rouissage, le ramollissement des racines facilite les étapes ultérieures de transformation.

Cependant le rouissage est une étape longue et assez mal contrôlée, au cours de laquelle peuvent apparaître des odeurs indésirables et qui s'accompagne de pertes importantes de matières sèche et d'une détérioration de la valeur nutritionnelle des produits du fait de la diminution des teneurs en minéraux et protéines et de l'augmentation de la teneur en fibres.

Si dans le cas du gari ou de l'attiéké, les conditions de fermentation sont relativement constantes, celles du rouissage, largement répandu en Afrique Centrale présentent une grande diversité. Outre les procédés classiques consistant à immerger pendant 3 à 6 jours les racines épluchées ou non, on a pu répertorier, en particulier au Congo, de nouvelles pratiques qui n'ont pas encore fait l'objet d'études : rouissage à sec de racines entières dans des trous tapissés de feuilles et recouverts de sable ou dans des sacs plastiques étanches, mise en sac plastique après rouissage traditionnel, de racines épluchées et écrasées dans des conditions voisines de l'ensilage lactique. Ces pratiques nouvelles présentent l'avantage de permettre un stockage et éventuellement le transport et la commercialisation du manioc, avant transformation finale.

Les résidus d'acide cyanhydrique présents dans les produits dérivés du manioc, rarement responsables de cas de toxicité aigüe, sont impliquées dans l'étiologie de certaines maladies fréquentes chez les populations consommatrices de manioc : goître et crétinisme, pancréatite calcifiante tropicale (diabète), neuropathie ataxique tropicale, démyélinisation du nerf optique...

Il est donc particulièrement important d'étudier l'efficacité des procédés traditionnels et de chercher à les rendre plus performants, en particulier pour permettre de répondre aux normes en cours d'élaboration dans les instances internationales, tout en assurant aux produits des qualités organoleptiques en accord avec les goûts alimentaires des populations concernées et en préservant leur valeur nutritionnelles.

Dans cette optique, deux démarches complémentaires et transférables d'une filière à l'autre de différents produits dérivés du manioc ont été retenues :

- utiliser les potentialités d'une bactérie aux systèmes enzymatiques connus présentant des potentialités intéressantes de détoxification,
- étudier le rôle des bactéries lactiques présentes au cours des processus traditionnels de fermentation et en particulier du rouissage en vue de définir les conditions optimales de leurs actions.

II. - OBJECTIF GENERAL DE TRAVAUX

Ces travaux s'inscrivent dans la problématique générale d'amélioration des techniques traditionnelles de transformation du manioc et de la recherche d'une solution au problème de sa toxicité. Ils sont conduits de manière à pouvoir à terme offrir une solution technologique adaptée au contexte technico-économique des pays en voie de développement et permettant d'une part d'assurer des taux résiduels de cyanures inoffensifs dans les produits dérivés du manioc et d'autre part de pouvoir maîtriser l'étape de fermentation pour l'obtention des goûts et arômes désirés qui varient d'une région à l'autre et d'une ethnie à l'autre comme première application la fabrication du gari.

Les volets que l'équipe se propose de développer au travers du programme envisagé sont :

- l'étude de l'évolution de la microflore lactique au cours de différentes forme de rouissage : isolement et sélection de souches lactiques jouant un rôle important dans ce processus,
- la mise au point d'une méthode de rouissage à sec permettant le stockage du manioc au cours de sa phase de production ; optimisation des paramètres (forme sous laquelle les produits sont mis à rouir, teneur en eau, rapport C/N, température, durée) en vue d'assurer une bonne élimination des cyanures et d'obtenir des produits ayant de bonnes qualités organoleptiques (odeur, texture) et nutritionnelles.

Sur le plan de la formation à la recherche, la participation à ce programme de chercheurs et étudiants du Laboratoire de Physiologie digestive de l'Université de Brazzaville et de l'INPT au Togo et d'étudiants du DESS Alimentation et nutrition dans les PED (USTL-Montpellier) ou de la section industrie alimentaire régions chaudes de l'ENSIA permettra de créer des liens de collaboration entre les laboratoires français, togolais et congolais.

III. - DEROULEMENT DES TRAVAUX

Le programme général des travaux est décomposé en quatre actions principales conduites sous la responsabilité d'un coordinateur

1.* Etude des différentes voies métaboliques de dégradation des composés cyanogénétiques (ENSAM)

- étude des deux β -glucosidases de *Brevibacterium* R312 et de leur régulation,
- spectre d'activités glucosidasiques de *Brevibacterium* R312
- mode d'actions des différents systèmes enzymatiques (β -glucosidases, nitrile-hydratase et amidase) et ordre d'attaque,
- conditions de pénétration de la souche sur le substrat

2.* Utilisation de la souche en fermenteur pilote sur de la pulpe de manioc (CEEMAT)

- conception et réalisation d'un fermenteur pilote à axe horizontal d'une capacité de 10 l répondant aux contraintes rhéologiques de la pulpe de manioc, permettant chargement et déchargement simultanés;
- étude des conditions de mélange
- suivi de la détoxification par *Brevibacterium* R312 suivant différents types de fonc-

tionnement (pH, température, aération, en milieu solide ou en milieu aqueux...), conséquences sur le développement de la fermentation lactique et influence sur les caractéristiques du produit final (couleur, goût, composition biochimique...)

Les travaux conduits doivent permettre :

- de dresser un bilan sur la faisabilité au niveau artisanal, semi-industriel ou industriel de la détoxification du manioc par voie biologique avec une souche de *Brévi-bactérium* R312
- de donner les axes complémentaires de recherches à conduire tant au niveau génie génétique ou microbiologique qu'au niveau technologique et cela en fonction des produits dérivés du manioc envisagés.

3.* Etude et influence des différents procédés de rouissage (ORSTOM Laboratoire de Nutrition)

A partir d'observations des procédés déjà utilisés au Congo et sur la base des essais préliminaires réalisés par Agricongo, on définira les modalités possibles de conditionnement des racines de manioc qui permettront de comparer les différentes techniques de rouissage. Parmi les alternatives proposées, on envisage d'inclure des essais comportant l'addition de matières premières permettant de faire varier le C/N.

Les modalités précédemment définies seront comparées quant à leur influence sur :

- les pertes au cours du processus,
- l'évolution de la microflore lactique,
- l'évolution du pH et l'apparition d'acides gras volatils, notamment d'acide lactique,
- les teneurs en cyanures sous forme libre ou associée et l'activité de certains facteurs antinutritionnels à différentes étapes des transformations,
- la composition en acides aminés, essentiellement pour les essais comportant l'addition de matières premières azotées,
- la composition en nutriments et les qualités organoleptiques (odeur, goût, texture, aspect) des produits finis (foufou et chicouangue)

4. * Etudes microbiologiques (ORSTOM Laboratoire de Biotechnologie)

On essaiera d'établir des corrélations entre le profil en acides gras volatils, les variations des teneurs en cyanures, le C/N et la présence de certains groupes de bactéries lactiques. Les principales espèces intervenant dans le processus de rouissage seront isolées. Des essais d'inoculation par des souches lactiques sélectionnées seront réalisés et le déroulement et les conséquences du rouissage étudiés sur la base des critères définis.

Une étude de corrélations entre les différents critères étudiés permettra de mettre en évidence les relations entre, d'une part, les principaux paramètres mesurés au cours du rouissage et, d'autre part, la valeur nutritionnelle et les qualités organoleptiques des produits obtenus.

Les résultats obtenus seront présentés en trois parties:

- La partie correspondant aux résultats obtenus par l'ENSAM et le CEEMAT, présentée par Michel JORY regroupe les points 1 et 2.
- La partie correspondant à tous les résultats des travaux obtenus par les différents participants du programme au Congo, rédigé par Serge TRECHE correspondant au point 3.
- La partie des résultats concernant la microbiologie et la physiologie des bactéries lactiques, correspondant au point 4, rédigée par Maurice RAIMBAULT.

**RAPPORT D'ACTIVITÉ du CEEMAT
sur le projet intitulé :**

**"Améliorations des mécanismes de détoxification
du manioc lors des phases de fermentation"**

(Décision MRES N° 88.L.0215)

novembre 1990
Michel Jory
chargé de recherches
CEEMAT/CIRAD

I- Présentation

I-1 Contexte général

Le CEEMAT/CIRAD, en lien avec un industriel: le SARL **Gauthier**, et un partenaire en régions chaudes : l'Institut National des Plantes à Tubercules (INPT) à Lomé (TOGO), mène des investigations sur la mécanisation de la fabrication du gari.

Le gari est une semoule de manioc fermentée, partiellement gélatinisée, et déshydratée. Les différentes opérations unitaires intervenant dans le procédé sont : Lavage, Epluchage, Râpage, Fermentation, Pressage, Emiettage, Défibrage, Cuisson/Séchage.

Une ligne de transformation mécanisée est en cours d'expérimentation au Togo mais l'opération de fermentation est conduite de manière traditionnelle. Cette opération est, en fait, essentielle pour l'obtention des goûts et des arômes caractéristiques du gari (fermentation lactique naturelle) et pour la détoxification du manioc. En effet, le manioc présente une certaine toxicité dans la mesure où ses tissus contiennent des composés cyanogénétiques qui sont des précurseurs d'acide cyanhydrique.

Ce problème de toxicité du manioc reste entier puisque les taux d'acide cyanhydrique, observés dans les produits dérivés du manioc, sont loin d'être négligeables, et implique la consommation du manioc parmi les causes de nombreuses maladies tropicales : neuropathie ataxique, crétinisme, goître, démyélinisation du nerf optique, pancréatite calcifiante [Sykes, A.H.; 1981]

L'ENSA de Montpellier a, par ailleurs, isolé une bactérie présentant une remarquable résistance au cyanure. L'étude de cette souche a révélé qu'elle était capable, grâce à plusieurs systèmes enzymatiques, de dégrader les différents composés cyanés du manioc et d'en utiliser l'azote pour sa propre croissance.

I-2 Objectifs

L'objectif recherché est la mise au point d'un processus de fermentation, qui nécessitera très vraisemblablement un fermenteur s'intégrant dans la ligne de fabrication de gari, et permettant :

- d'obtenir les goûts et arômes caractéristiques du produit fini, qui varient sensiblement suivant les zones géographiques et suivant les ethnies.
- d'assurer des taux résiduels de cyanures très faibles dans le produit fini, garantissant l'inocuité pour le consommateur et la satisfaction de la norme africaine (en projet) fixant la teneur maximum en cyanures totaux à 2 ppm

I-3 Partenaires

- **CEEMAT/CIRAD** (Centre d'Etude et d'Expérimentation en Mécanisation Agricole et Technologie Alimentaire / département du Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), Division Génie et Technologie Alimentaires
- **ENSA-M** (Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie - Montpellier), chaire de microbiologie industrielle et de génétique des microorganismes
- **INPT** (Institut National des Plantes à Tubercules), Programme manioc (TOGO)
- **S.A.R.L. Gauthier** (FRANCE)

I-4 Programme général des travaux

- **Analyse technologique du procédé traditionnel (CEEMAT, INPT)**
 - * influence de la fermentation sur la qualité du produit fini
 - * influence des traitements technologiques, et en particulier de la fermentation, sur l'élimination des composés cyanogénétiques
- **Etude des possibilités de détoxification par une souche bactérienne exogène (ENSAM, CEEMAT)**
 - * étude des systèmes enzymatiques de Brevibacterium sp. R312
 - * amélioration des activités enzymatiques de cette souche
 - * recherche des possibilités de transfert des systèmes enzymatiques de Brevibacterium sp. R312 à une souche de Lactobacillus
- **Recherche d'une optimisation du procédé naturel de détoxification (CEEMAT)**
 - * observation de l'influence de la maîtrise du pH de la pulpe de manioc, de son aération et du drainage des jus d'égouttage, sur la cinétique de fermentation/détoxification
 - * définition des équipements nécessaires et d'un protocole de conduite de la fermentation
- **Transfert du procédé (CEEMAT, INPT, Gauthier)**
 - * réalisation des équipements
 - * mise en place d'un protocole de contrôle de la qualité en cours de fabrication et sur le produit fini
 - * promotion commerciale du gari "détoxiqué"

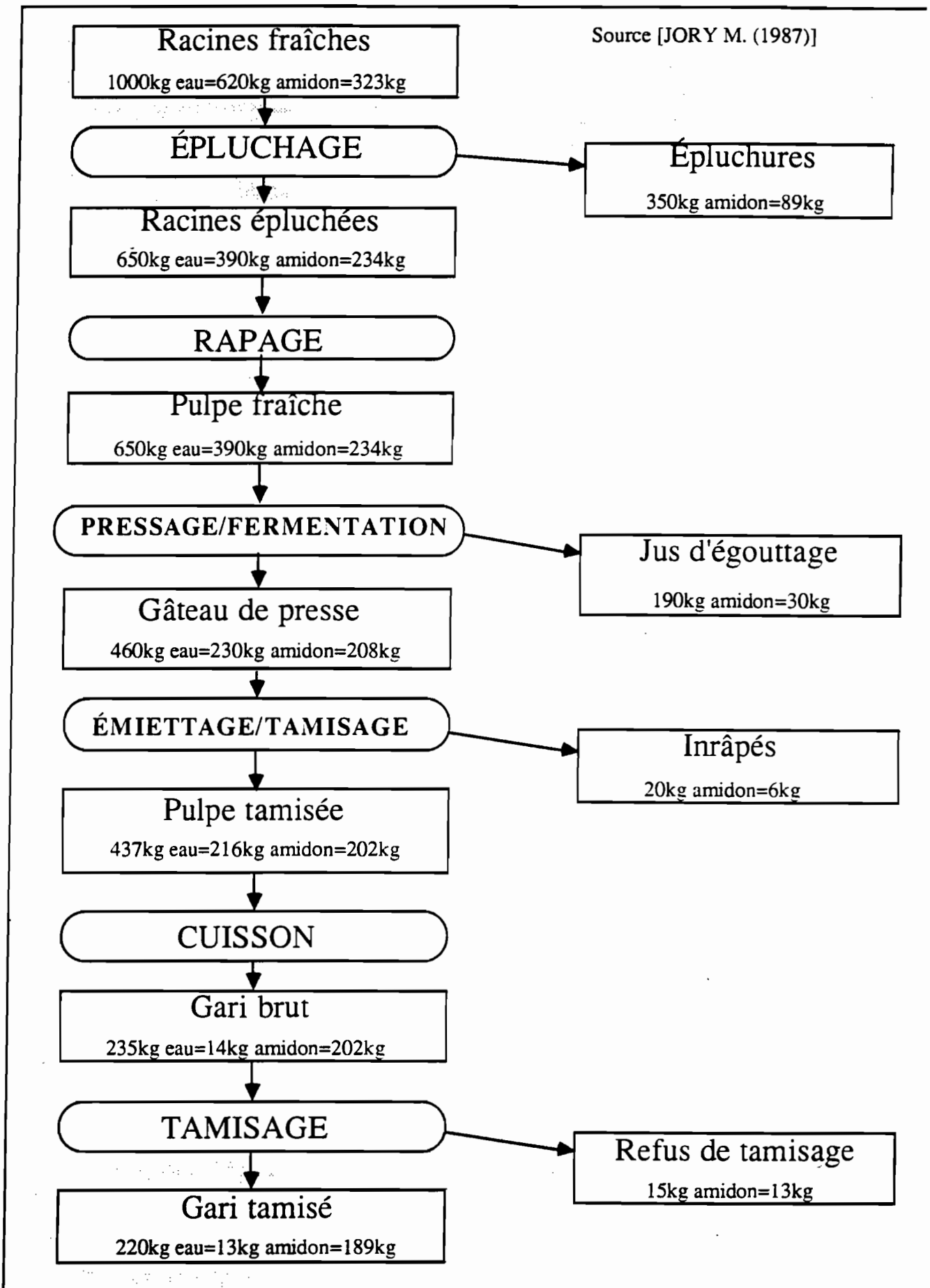


Figure 1 : flow sheet de la fabrication du gari (source Jory, M.;1987)

II- Rappel des résultats antérieurs

II-1 Observation du procédé traditionnel (Voir Fig. 1)

Les racines de manioc doivent tout d'abord être épluchées afin d'éliminer les écorces externe et interne. Cet opération, si elle s'accompagne d'une perte d'amidon, permet de réduire considérablement les teneurs en cyanures et en fibres du produit fini, et améliore notablement la durée de vie de l'outil de râpage.

Lorsque les racines ont été épluchées à la main, un rinçage à l'eau s'impose pour éliminer les traces de terre. Le manioc peut ensuite être râpé, soit à la main sur un morceau de tôle perforée présentant des bavures, soit dans une râpe mécanique.

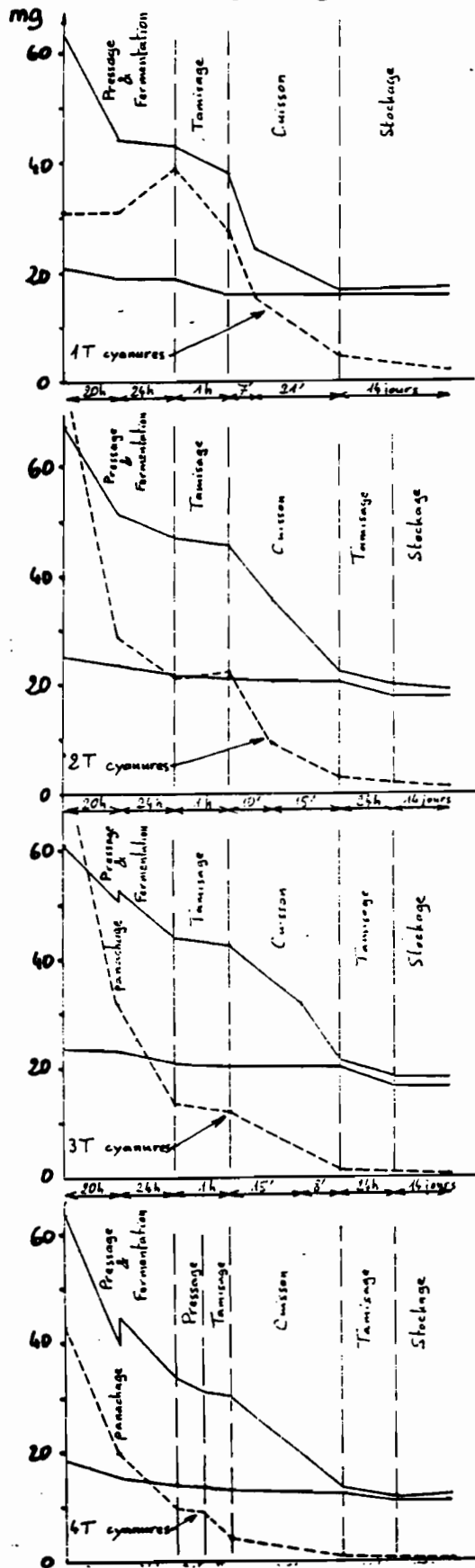
La pulpe obtenue est traditionnellement mise dans des sacs en toile de jute et immédiatement essorée par pressage. La pression est maintenue pendant plusieurs jours pendant lesquels la pulpe subit simultanément une fermentation spontanée. Cette fermentation varie entre 2 et 5 jours suivant l'acidité recherchée. La charge de pierres ou de bûches de bois qui est disposée sur les sacs est calculée empiriquement pour qu'au terme de la durée requise de fermentation, l'essorage ait permis d'atteindre environ 50% d'humidité, valeur optimale pour la cuisson. Les jus d'égouttage peuvent être récupérés pour produire du tapioca à partir de l'amidon décanté.

Après ce pressage, le gâteau de presse doit être émietté et tamisé. Ces deux opérations sont traditionnellement réalisées simultanément en frottant, à la main, le gâteau de presse sur un tamis. L'utilisation d'une machine similaire à la râpe mécanique pour exécuter la re-fragmentation du gâteau de presse impose une opération distincte de tamisage sur un tamis vibrant afin d'éliminer les très longues fibres et les fragments de racines intrâpés.

L'opération de cuisson est réalisée dans des canaris en terre cuite, d'environ 80 cm de diamètre sur 15 cm de profondeur, disposés sur un feu de bois. Jusqu'à aujourd'hui, aucun système mécanique n'est parvenu à remplacer parfaitement le tour de main des opératrices traditionnelles. En effet, aux phénomènes physiques qui doivent intervenir dans chaque grain de la pulpe (transfert de chaleur, gélatinisation de l'amidon, séchage, "toastage"), se conjuguent des phénomènes macroscopiques de formation de grumeaux et de modification des propriétés rhéologiques de la pulpe. Cependant, les derniers résultats des observations de ces phénomènes devraient permettre de mécaniser prochainement cette opération.

Le gari obtenu est généralement tamisé de manière à éliminer les rares grumeaux qui ont échappé à la vigilance de l'opératrice pendant la cuisson. Le produit fini présente une teneur en eau de l'ordre de 10% bh, ce qui lui confère une très grande aptitude à la conservation. L'amidon est gélatinisé à environ 70% et les cyanures résiduels sont aux alentours de 15 µg/g. Cependant, ces valeurs moyennes s'accompagnent d'une très large dispersion puisque les gari traditionnels rencontrés sur les marchés togolais et béninois oscillent entre 50 et 80% de taux de gélatinisation et entre 10 et 35 µg/g de cyanures [Chuzel, G.; Griffon, D.; 1987]. Un faible taux de gélatinisation rend le gari moins digeste sans qu'une corrélation n'ait pu être mise en évidence avec l'acceptabilité organoleptique du produit. Les fortes valeurs de cyanures résiduels font craindre des intoxications graves puisque la consommation de gari au cours d'un repas atteint couramment 150 g et correspond alors à environ 5 mg de cyanure soit 10% de la dose létale (50 à 60 mg pour un adulte).

fermentation et pressage simultanés



6

fermentation et pressage dissociés

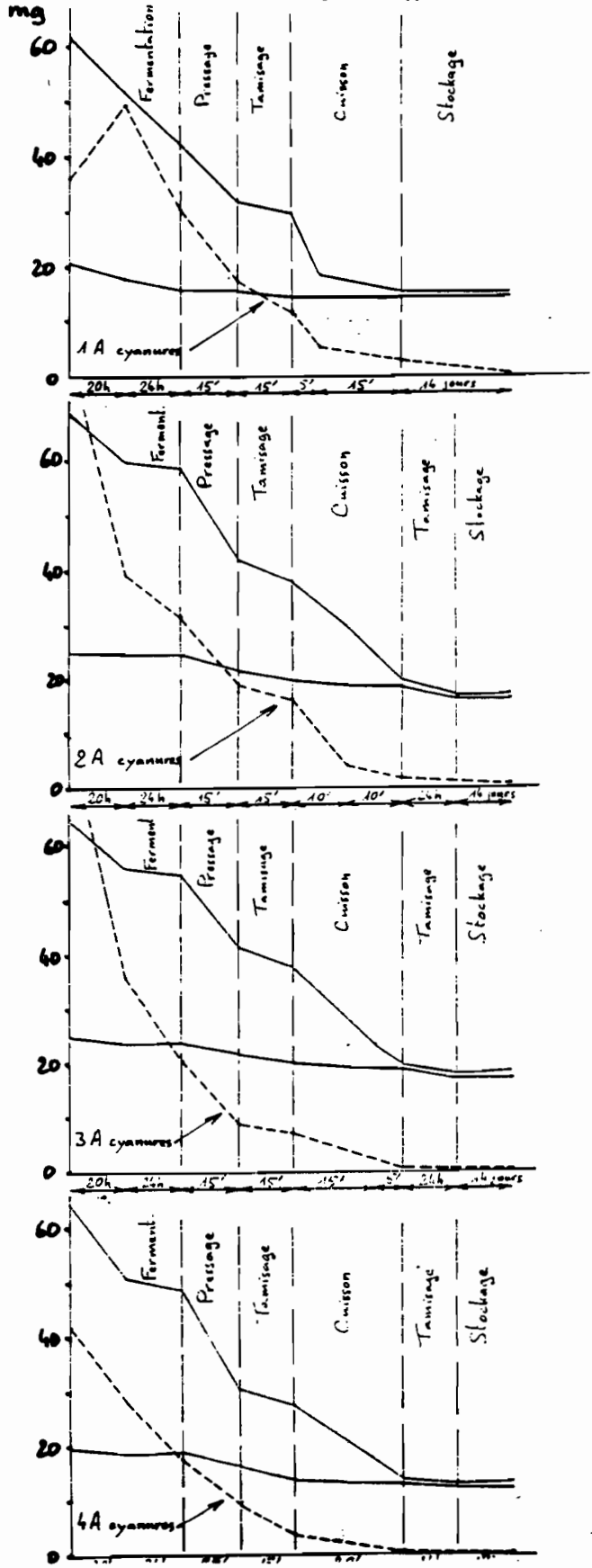
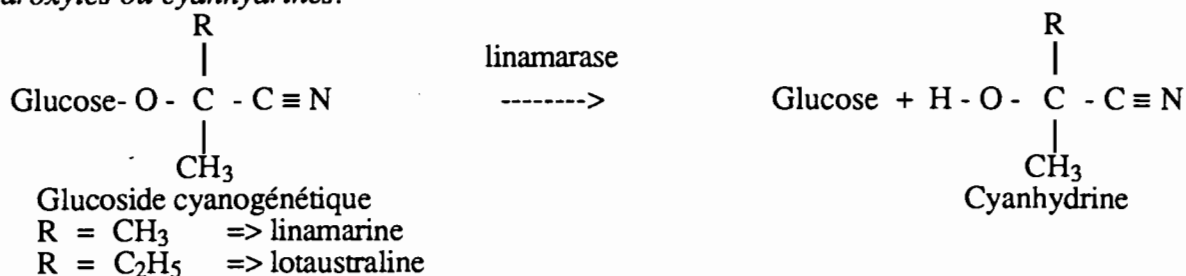


Figure 2 : observation de la dégradation des cyanures totaux lors de 8 traitements de 100 kg de manioc (Source [Jory, M. (1987)])

Les deux lignes en trait continu montrent respectivement l'évolution de la matière totale et de la matière sèche (en kg)

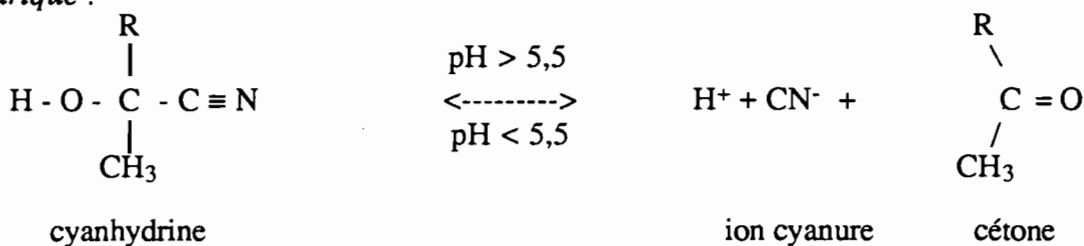
II-2 Processus naturel de détoxication

La toxicité du manioc provient de deux cyanoglucosides : la linamarine et la lotaustraline, dont les proportions habituelles sont respectivement 96% et 4% [Butler (1965)]. Ces glucosides cyanogénétiques sont présents dans le cytoplasme des cellules. Les noyaux des cellules renferment par contre une enzyme, la linamarase, capable de dégrader ces deux glucosides en nitriles α -hydroxylés ou cyanhydrines.



Cette enzyme a un pH optimum voisin de 6,5 et se trouve totalement inhibée en dessous de 5. La température d'activité maximum est voisine de 30°C.

Les cyanhydrines formées peuvent se dégrader à leur tour pour donner des cétones et de l'acide cyanhydrique :



Cette réaction chimique est d'autant plus rapide que le pH est élevé. Elle est réversible pour un pH < 5,5

Si le pH est ensuite abaissé aux alentours de 4,5, le cyanure subit un "recul d'ionisation" et prend une forme moléculaire : HCN. Sous cette forme, l'acide cyanhydrique est particulièrement volatil.

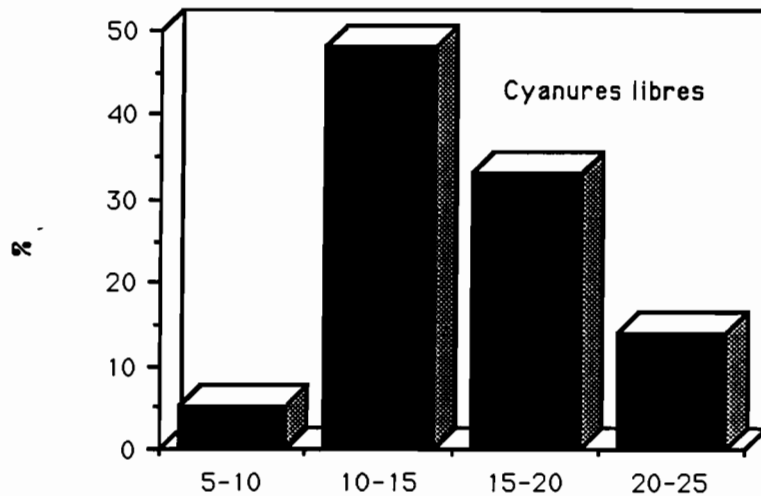
Ce processus ne parvient hélas jamais à se dérouler complètement car l'abaissement du pH, dès les premières heures qui suivent le râpage, inhibe l'enzyme endogène. Les cyanhydrines formées sont alors stables de même que les cyanoglucosides résiduels. Les ions cyanures libérés ont, par contre, tendance à former de l'acide cyanhydrique qui sera très facile à éliminer lors du pressage et lors de la cuisson. Il est vraisemblable que l'élimination du cyanure au cours de la cuisson réamorçait la seconde réaction et dégradait une partie des cyanhydrines résiduelles mais, du fait du pH très bas (voisin de 3,5), l'importance de ce phénomène ne peut être que très faible.

Certaines observations ont pu être faites dans l'unité expérimentale de Davié (Togo) sur 4 lots de manioc de la même variété [Jory, M.;1987] et par deux variantes du procédé traditionnel. Les analyses étaient réalisées dans un laboratoire situé à Lomé, après transport rapide des échantillons en glacière réfrigérée. Ces observations permettent d'appréhender le processus de détoxication au cours de la fermentation traditionnelle (voir Fig. 2).

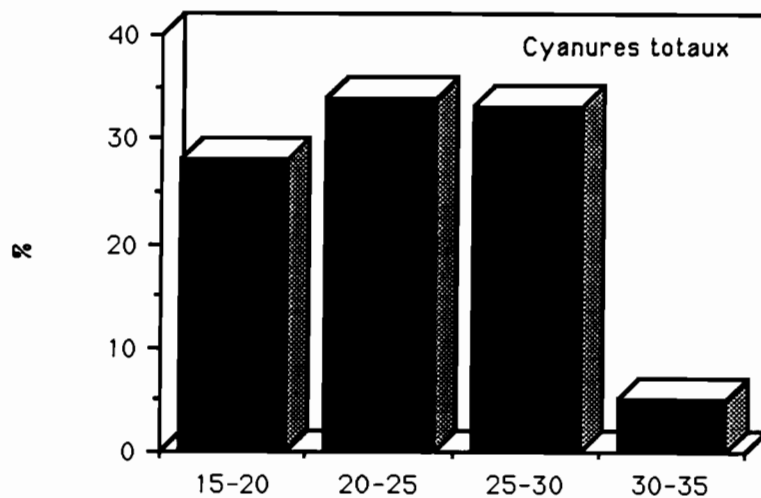
Deux expérimentations, conduites au CEEMAT à Montpellier dans un fermenteur pilote d'environ 15 litres, ont permis de confirmer la possibilité de simuler fidèlement le procédé traditionnel et d'étudier avec davantage de précision les cinétiques de dégradation des cyanures et de formation d'acides organiques.

=> Toutes ces observations confirment l'hypothèse d'une accumulation des cyanures sous la forme de cyanhydrines. Malgré tout, cette fermentation permet de rendre éliminable par les opérations suivantes une part importante (60 à 80%) des cyanures liés initialement présents et stables dans le manioc.

II-3 Analyse de garis commercialisés sur des marchés africains



Cyanures libres (en µg d'ion CN⁻ par g de matière sèche)



Cyanures totaux (en µg d'ion CN⁻ par g de matière sèche)

Figure 3 : Fréquence de distribution des cyanures libres et totaux dans des garis togolais et béninois (source Chuzel, G.; Griffon, D.;1987).

=> Mise en évidence des taux résiduels de cyanures ne présentant pas un caractère inoffensif systématique (teneurs entre 5 et 25 ppm en cyanures libres et entre 15 et 35 ppm en cyanures totaux)

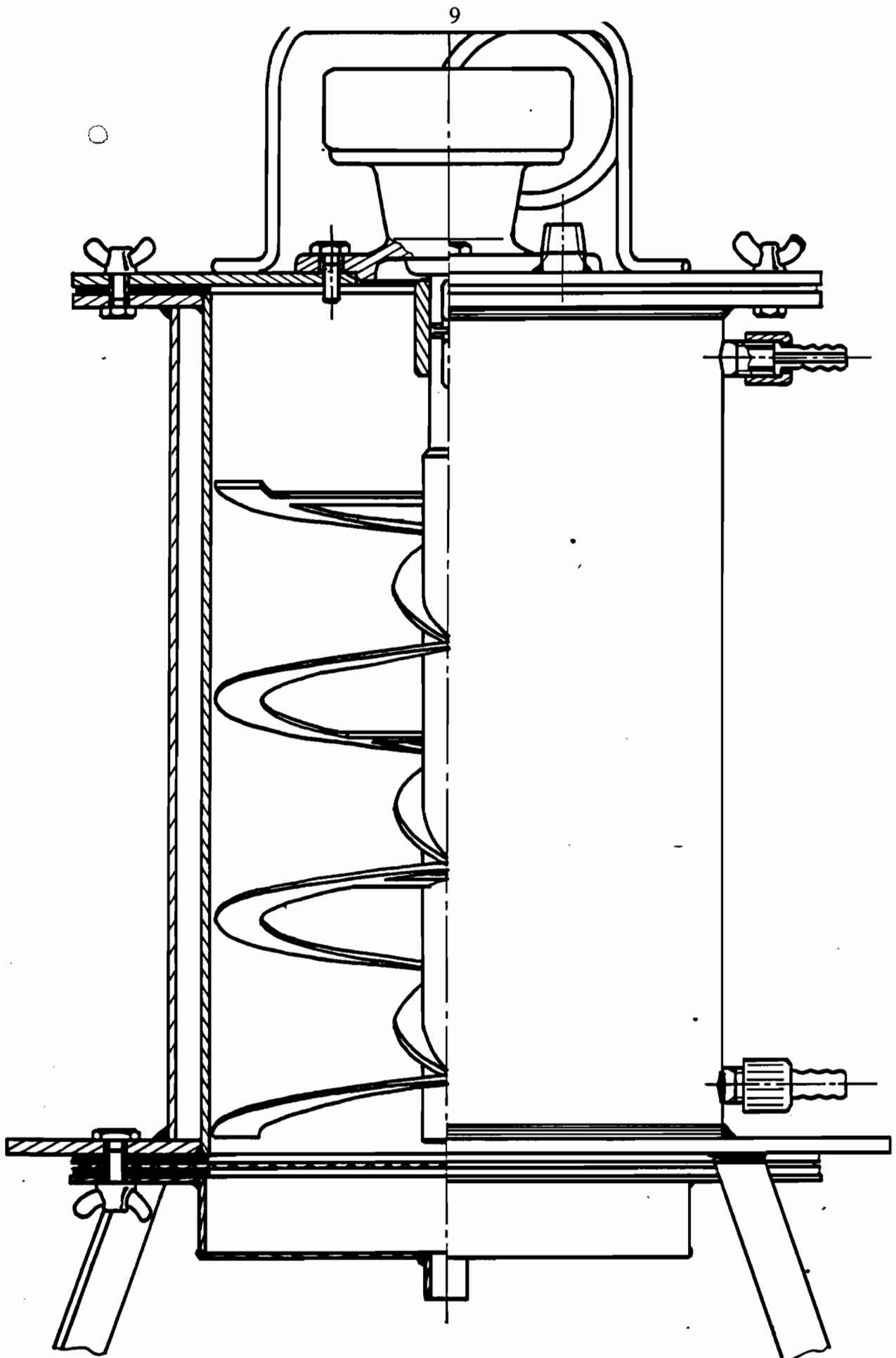


Figure 4 : schéma du fermenteur pilote vertical à mobile hélicoïdal

II-4 Etude d'un procédé de fermentation amélioré

Deux possibilités d'amélioration de la détoxification ont été envisagées :

- Optimisation du processus naturel de détoxification par maîtrise du pH :
 - * Phase 1 : régulation du pH de la pulpe sur une consigne voisine de 7 afin de favoriser l'hydrolyse des cyanhydrines en acide cyanhydrique, sans inhiber l'action de la linamarase endogène
 - * Phase 2 : acidification par fermentation lactique naturelle
- Détoxification par voie microbiologique :
 - * Phase 1 : détoxification du manioc par l'utilisation de Brevibacterium sp. R312 qui présente des potentialités intéressantes (activités nitrile hydratase, amidase et β -glucosidase) en vue de dégrader les différentes formes de cyanures en acides formique et 2-hydroxyisobutyrique (Voir Fig. 5)
 - * Phase 2 : fermentation après inoculation d'un "starter lactique"

II-41 Tentative de maîtrise du pH pendant les premières heures de la fermentation de façon à optimiser la détoxification

Deux suivis de fermentation / détoxification ont été réalisés au CEEMAT, dans ce fermenteur pilote de 15 litres, avec régulation du pH à 6,5 pendant les 12 premières heures.

Pendant la première expérience, le jus qui s'égouttait était régulé au pH 6,5 avant d'être ré-injecté dans le fermenteur. La faible vitesse de circulation du jus rendait peu efficace ce système de régulation et n'empêchait pas totalement le pH de chuter. L'amélioration de la détoxification, par rapport au témoin fermenté sans agitation ni intervention sur le pH, paraissait toutefois significative.

La seconde expérience consistait à mesurer le pH de la pulpe et de rajouter des petites quantités de soude directement dans le fermenteur. La régulation était beaucoup plus efficace mais la pulpe, sous les effets conjugués des contraintes de cisaillement provoquées par le mobile de malaxage et d'un phénomène de nixtamalisation de l'amidon par les gouttes de soude concentrée, subissait des modifications rhéologiques considérables. La pulpe issue de cette seconde expérience n'était plus utilisable pour produire du gari tant la texture s'était dégradée. L'amélioration de la détoxification n'était pas significative.

=> mise en évidence de modifications très importantes et indésirables des qualités rhéologiques de la pulpe sous les effets conjugués de la soude et des contraintes de cisaillement engendrées par l'agitateur

II-42 Détoxification par voie microbiologique en utilisant Brevibacterium sp. R312

Aucun essai n'avait pu être réalisé sur de la pulpe de manioc dans des conditions correctes avant le présent contrat. Seules quelques expérimentations en milieu liquide fortement agité et aéré et en milieu pâteux non malaxé, avaient permis de cerner le potentiel de cette souche.

II-5 Etude de brevibacterium sp. R312

Les 3 systèmes enzymatiques de Brevibacterium sp. R312 (β -glucosidase, nitrile hydratase et amidase) avaient été décelés. La nitrile hydratase [Arnaud, A.; 1984], [Bui et al; 1984] et l'amidase [Maestracci, M.; 1985], [Maestracci et al; 1986] avaient déjà assez bien étudiées. La β -glucosidase était encore très peu connue et apparaissait comme insuffisamment active pour "épauler" efficacement la linamarase endogène du manioc.

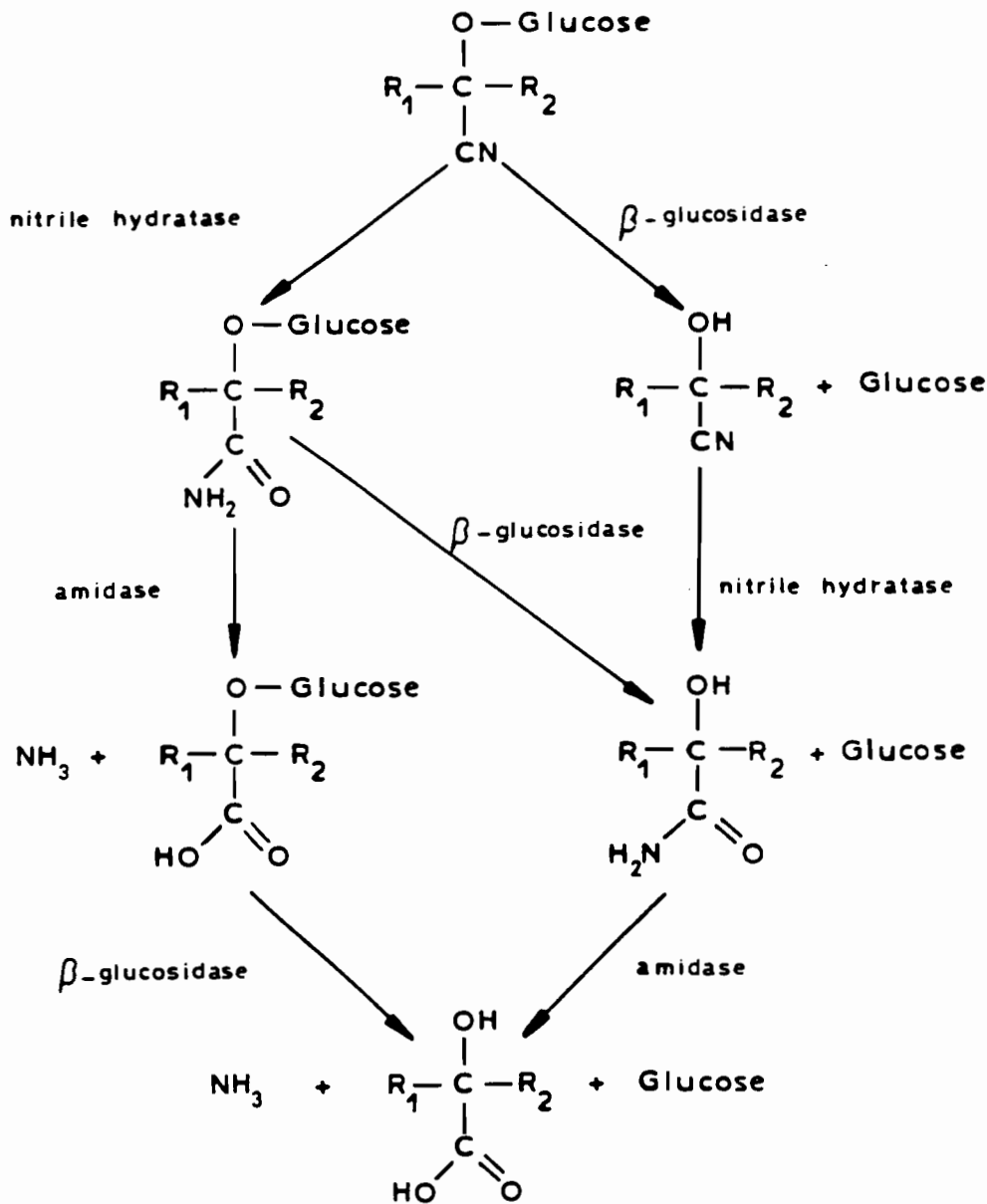


Figure 5 : Les différentes voies de dégradation des cyanoglucosides ouvertes par les 3 systèmes enzymatiques de Brevibacterium sp. R312

III- Travaux réalisés dans le cadre du contrat

III-1 Etude des possibilités de détoxication par une souche bactérienne exogène (ENSAM, CEEMAT)

III-11 Essai de la souche originale Brevibacterium sp. R312

Un essai a été conduit à l'ENSAM en fermenteur pilote Biolafitte de 2 litres afin d'observer la croissance de la souche Brevibacterium R312 ainsi que ses potentialités de détoxication du manioc. Le type d'agitateur de ce fermenteur impliquait que la pulpe de manioc soit additionnée d'eau de manière à en diminuer la viscosité. Ce type de fermenteur, et les précautions prises au moment du broyage du manioc, permettaient d'éviter les contaminations extérieures mais la pulpe ne pouvait toutefois pas être stérilisée sous peine de détériorer ses caractéristiques rhéologiques et d'inactiver la linamarase endogène. La croissance de Brevibacterium R312 dans ce milieu fut faible et tardive. Le développement des bactéries lactiques et l'acidification de la pulpe furent perturbés, vraisemblablement à cause de la forte aération du milieu. La détoxication fut très rapide dès l'inoculation de Brevibacterium R312 mais, comme en atteste la fermentation témoin, l'aération importante du milieu permettait d'atteindre le même résultat après 4 heures.

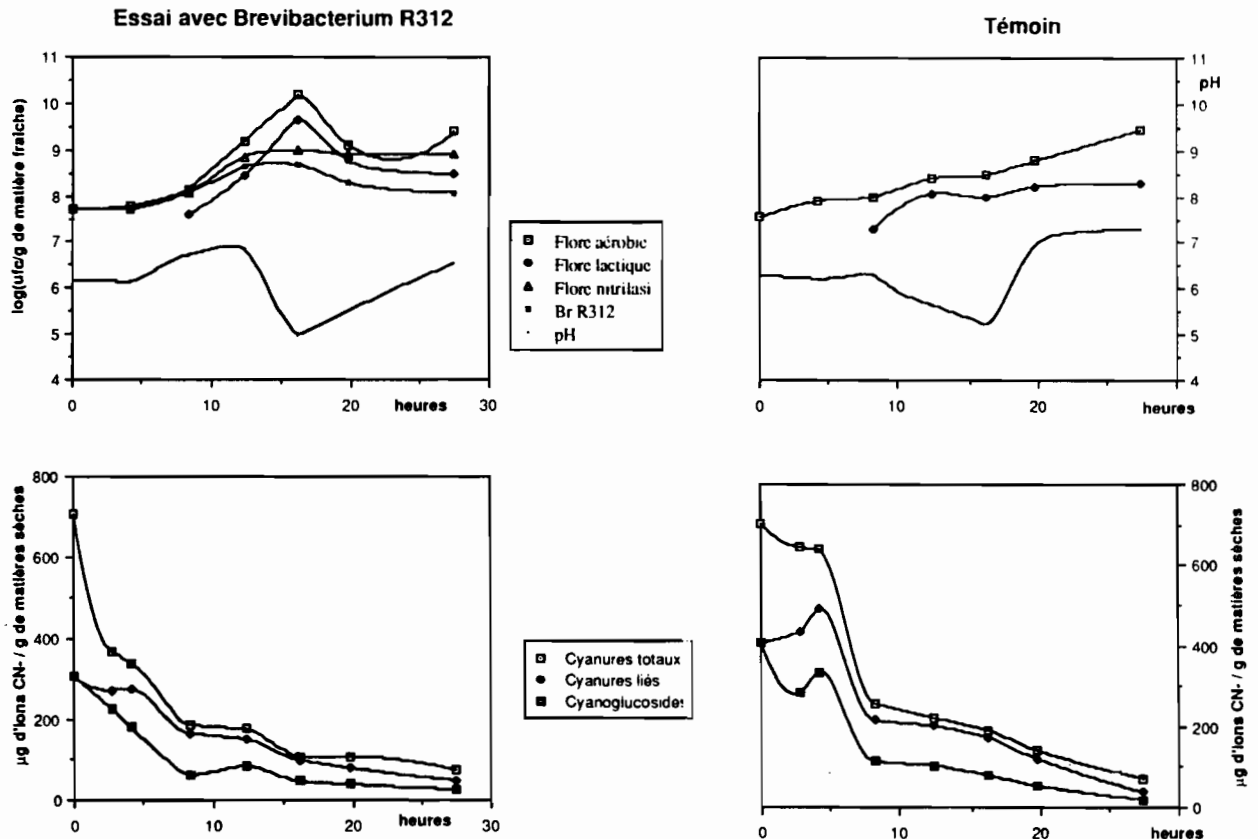
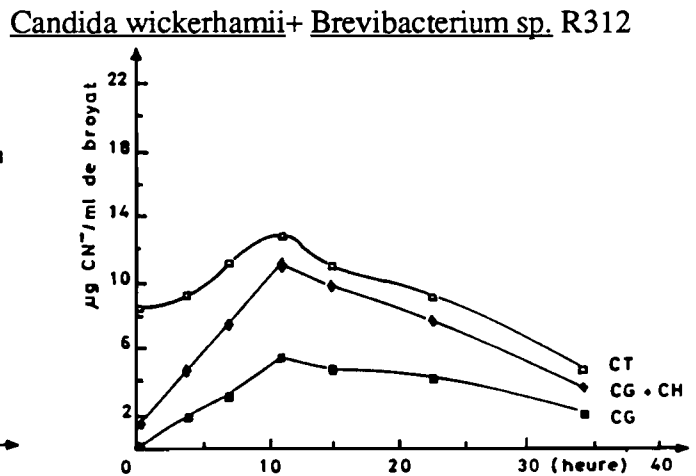
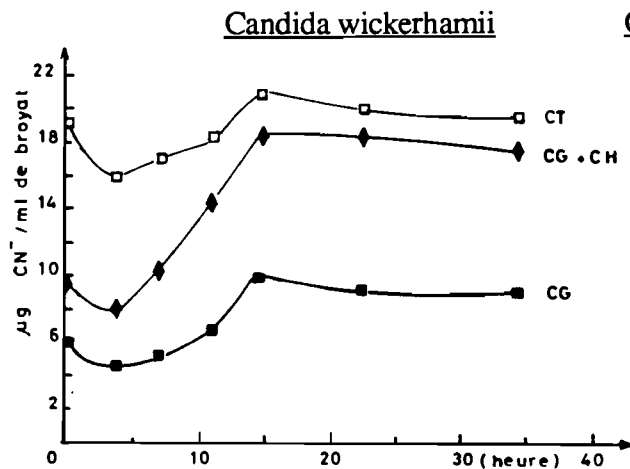
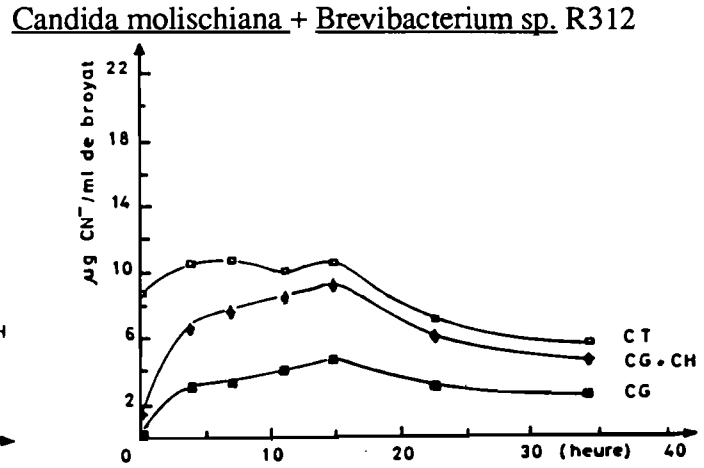
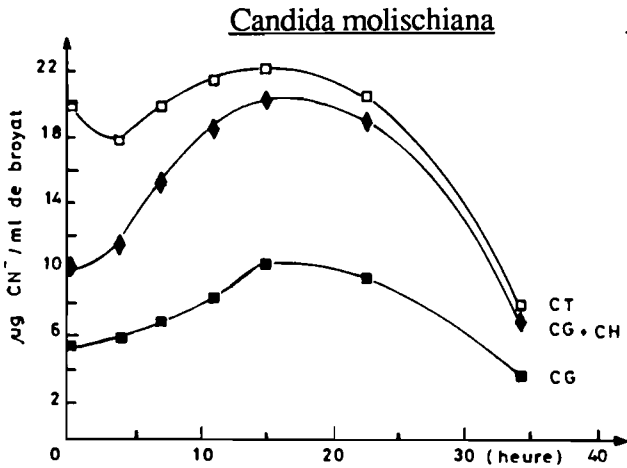
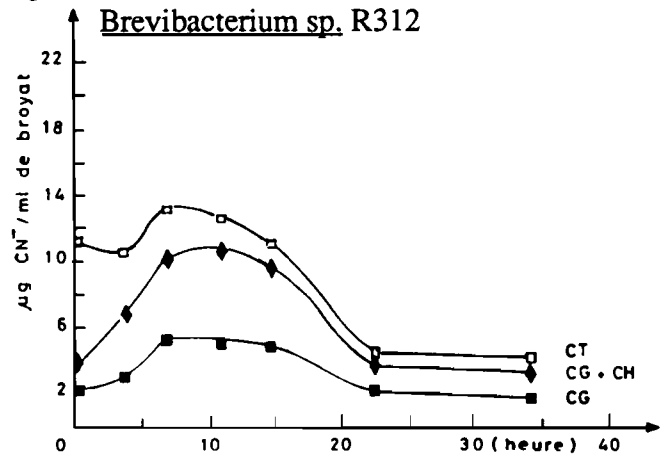
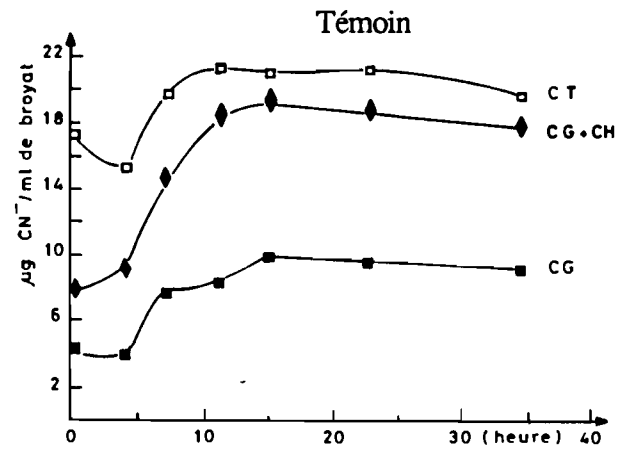


Figure 6 : Détoxication de pulpe de manioc par Brevibacterium en milieu liquide, agité et aéré.



Brevibacterium sp. R312 + β -glucosidase

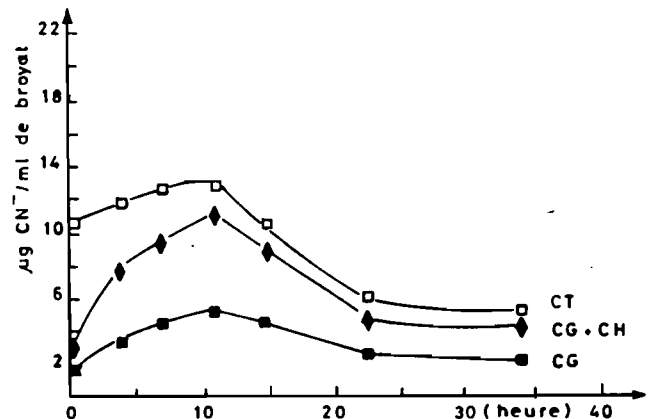


Figure 7 : Essai comparatif de différents inoculum sur la détoxification de pulpe de manioc en milieu liquide et agité

Un essai comparatif entre différentes souches fut mené, cette fois dans des erlenmeyers agités. La pulpe avait encore dû être humidifiée jusqu'à environ 90% bh afin que l'agitation soit efficace. Les 4 lots inoculés avec Brevibacterium R312, seule ou en association avec une autre souche ou une β -glucosidase, subirent une détoxification très rapide par rapport au témoin non inoculé et même par rapport aux lots inoculés avec seulement une souche de levure à activité β -glucosidasique. Dans tous les cas, l'humidité élevée et l'agitation perturbèrent plus ou moins le développement des bactéries lactiques. (Voir Fig. 7)

Enfin un dernier essai s'attacha à l'observation plus précise de la cinétique de détoxification dans les premières minutes suivant l'inoculation d'une biomasse de Brevibacterium R312. Cet essai fut réalisé au CEEMAT sur une pulpe de manioc non humidifiée, donc à environ 70% bh, et placée dans un bac non fermé. La détoxification obtenue immédiatement après l'inoculation put être observée mais ne fut pas aussi importante que lors des essais précédents, sans doute à cause d'un mauvais mélange de l'inoculum dans la pulpe.

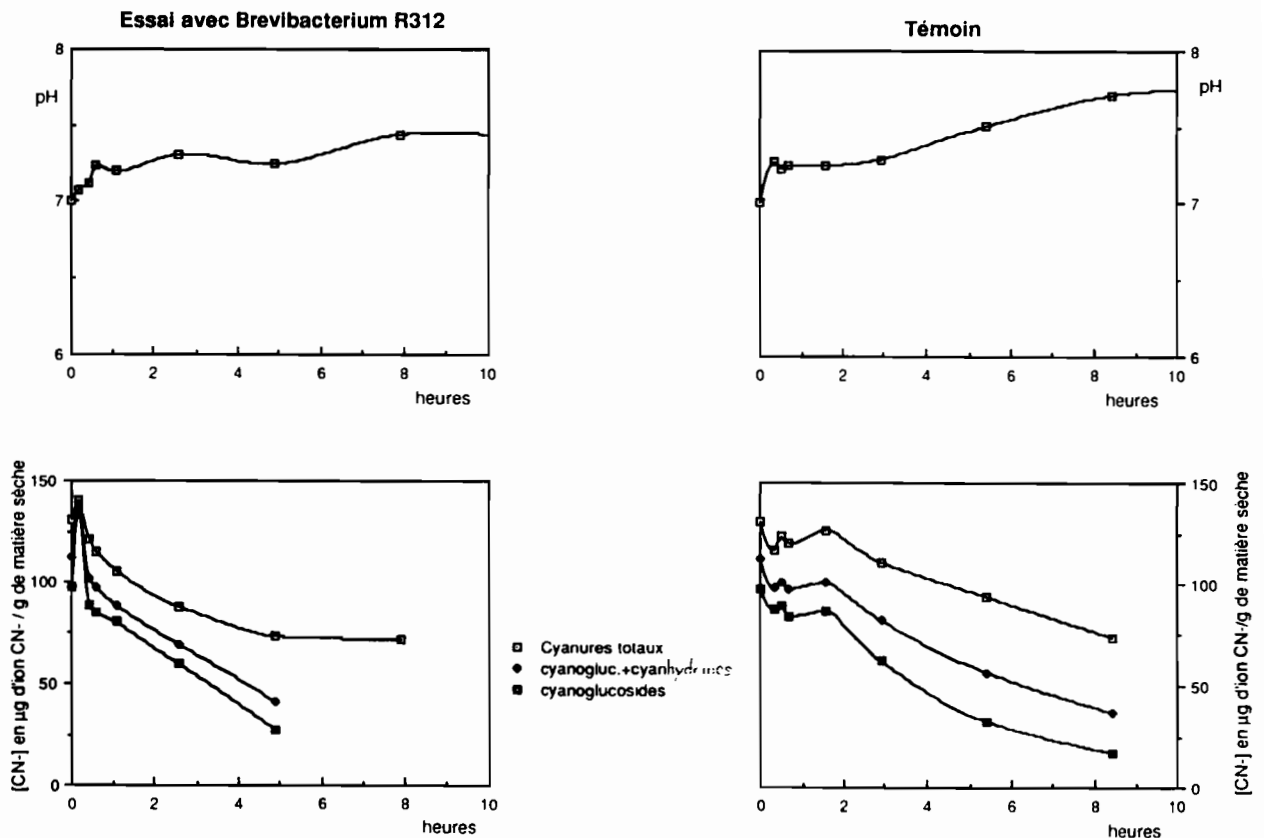


Figure 8 : Détoxification de pulpe de manioc par Brevibacterium en milieu pâteux, non agité et non aéré

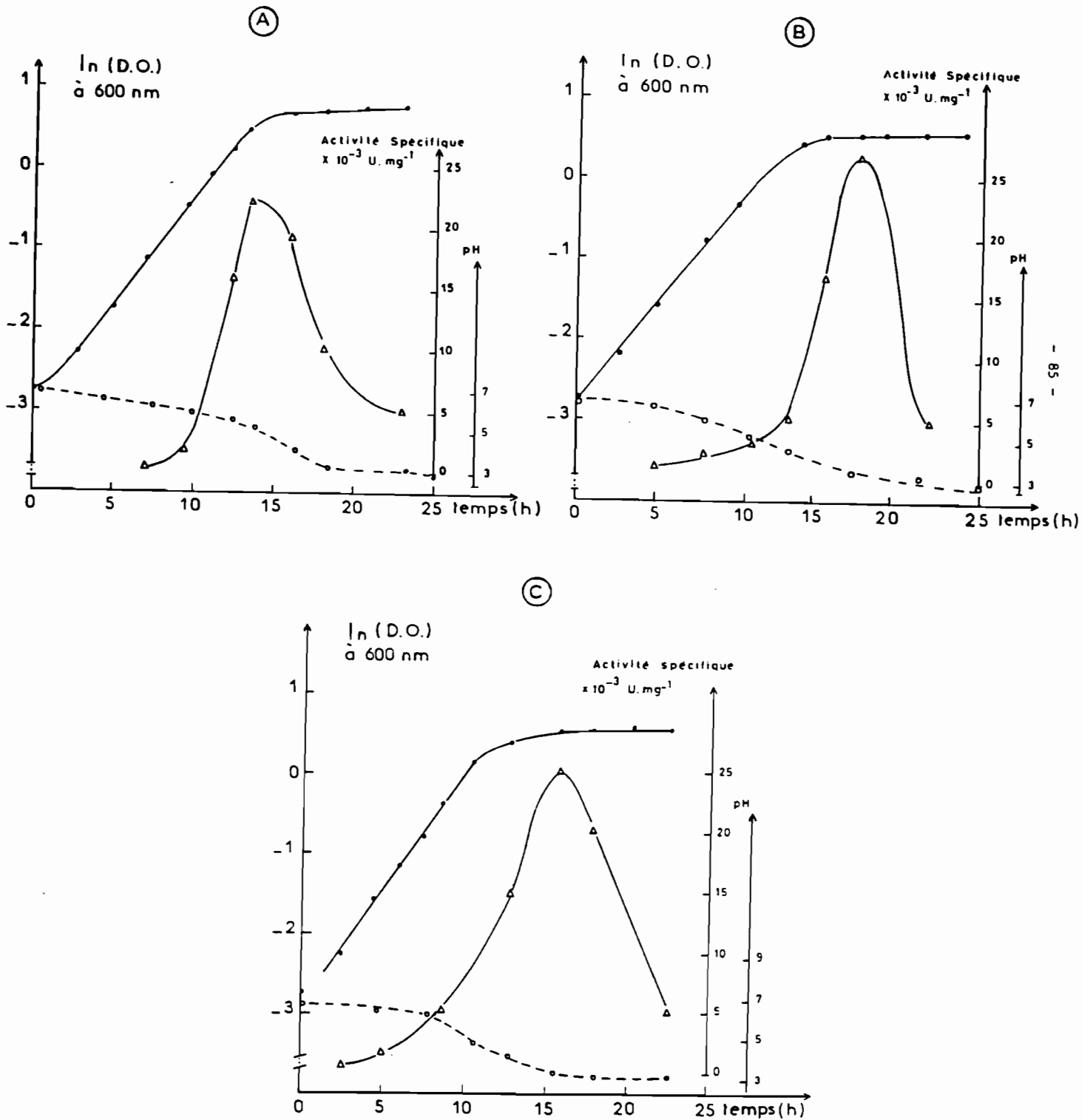
III-12 Étude de la β -glucosidase de Brevibacterium sp. R312

Figure 9 : Courbes de biosynthèse de la β -glucosidase de Brevibacterium sp. R312 au cours de la croissance sur des milieux de culture contenant 0,5% de glucose (A), 1% de glucose (B), ou 2% de glucose (C).

●—● Absorbance à 600 nm
 ▲—▲ Activité β -glucosidasique ($U \cdot mg^{-1}$)
 ○ - - - ○ pH

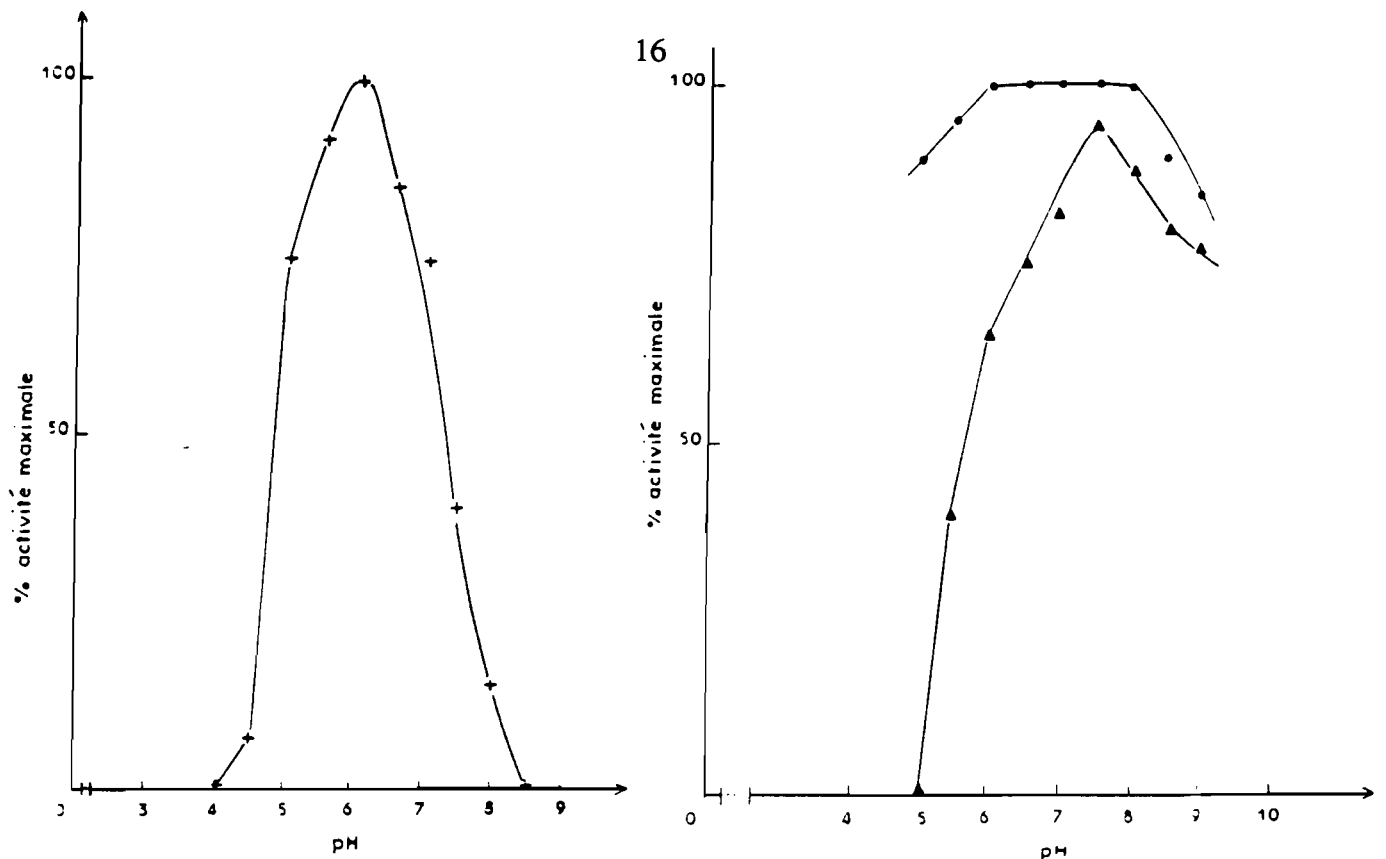


Figure 10 : Spectre et stabilité de l'activité β -glucosidasique en fonction du pH :

- + cinétiques effectuées à 30°C en présence de 5mM de pNPG
- cinétiques effectuées à 30°C, pH 6, et en présence de 5mM de pNPG après 3h de séjour au pH indiqué en abscisse
- Δ cinétiques effectuées à 30°C, pH 6, et en présence de 5mM de pNPG après 15h de séjour au pH indiqué en abscisse

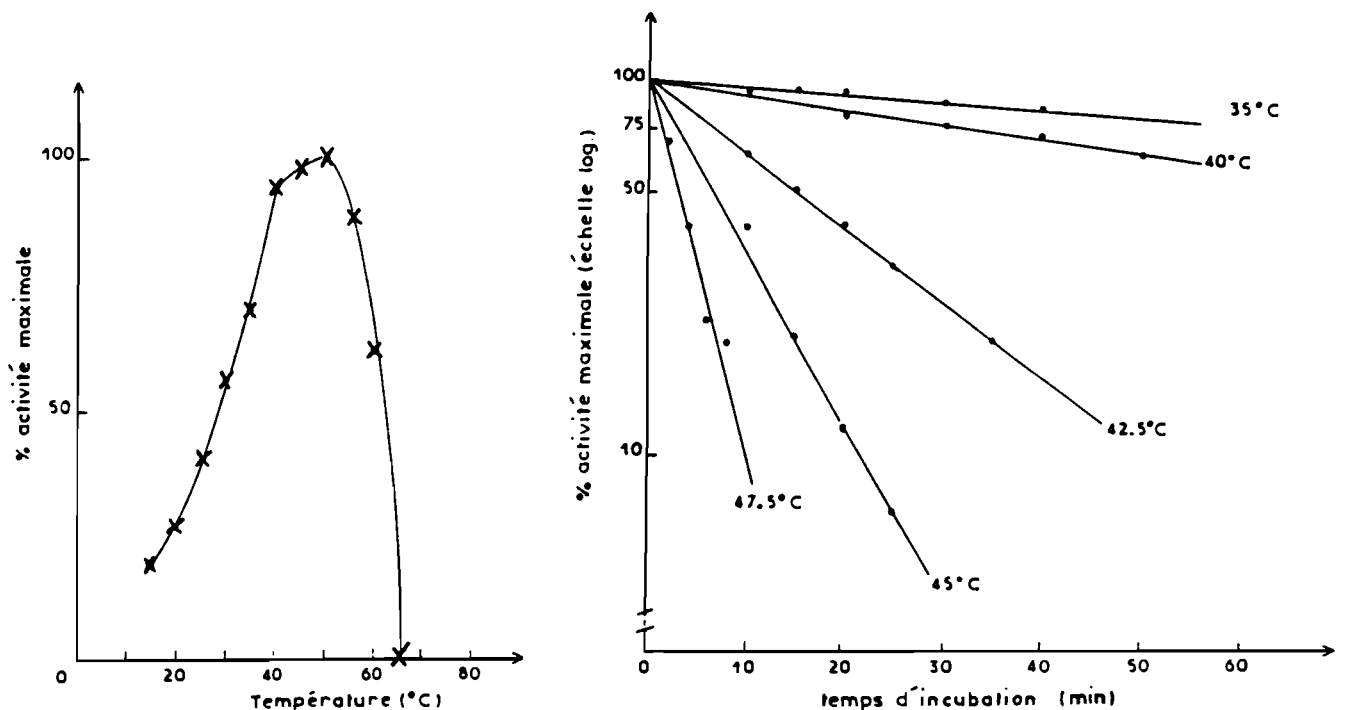


Figure 11 : Spectre d'activité et stabilité de l'activité β -glucosidasique en fonction de la température

- x cinétiques effectuées à pH 6, en présence de 5mM de pNPG
- cinétiques effectuées à pH 6, 30°C, en présence de 5mM de pNPG, après dénaturation thermique à la température et pendant le temps indiqués

Temps d'incubation (heures)	citrate de MAC ILVAINE	phosphate de SORENSEN	Tris HCl	Hepes NaOH
0	100	100	100	100
24	62	50	34	20
48	39	28	21	1

Figure 12 : Stabilité de la β -glucosidase dans différents tampons

Substrat	Km (mM)	Vm (U.mg ⁻¹)
pNPG	0,054	1,24
oNPG	0,086	0,44
Esculine	1,7	1,70
Arbutine	5,6	1,30
Salicine	6,4	9,30
Prunassine	0,39	3,20
Linamarine	3,7	0,85
pNP Xylose	0,35	0,07

Figure 13 : Km et Vm de la β -glucosidase vis à vis de différents cyanoglucosides (dont la linamarine, cyanoglucoside dominant du manioc)

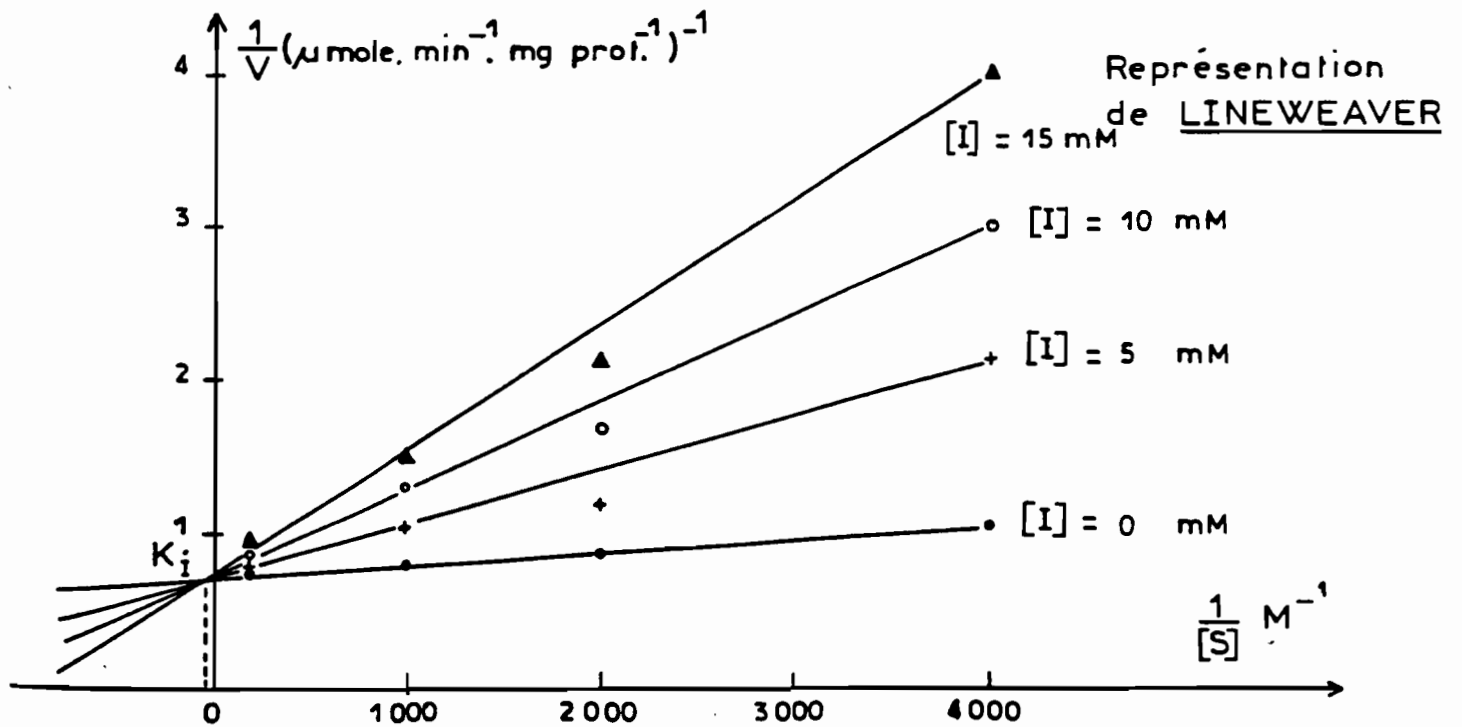
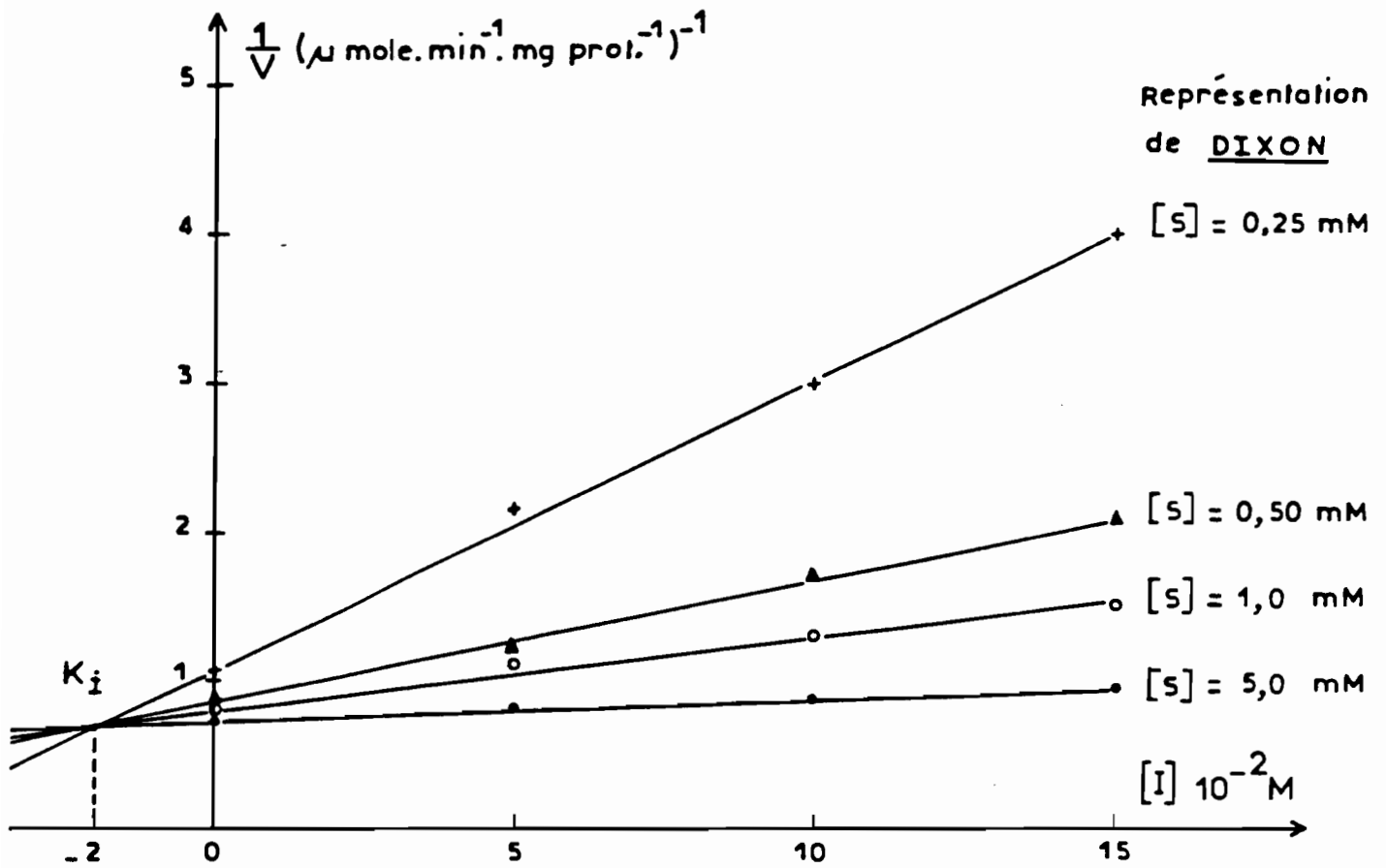


Figure 14 : Inhibition de l'activité β -glucosidasique par le glucose

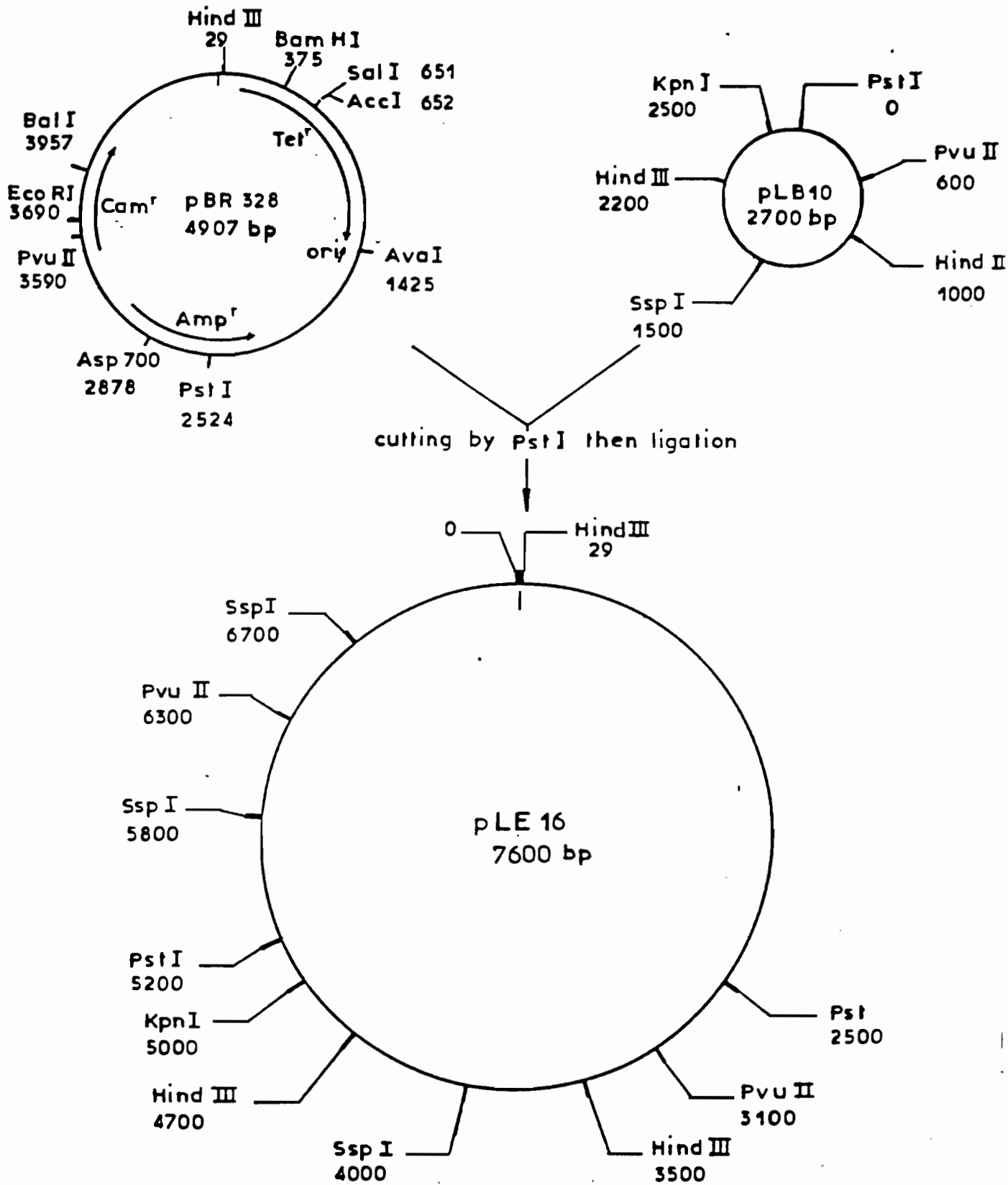


Figure 15 : Sites de restriction du plasmide pLE 16

III-13 Recherche des possibilités de transfert des systèmes enzymatiques de Brevibacterium sp. R312 à une souche de Lactobacillus

L'ENSAM a poursuivi ses travaux de clonage, chez Escherichia coli, des gènes des activités nitrile-hydratase et amidase provenant de Brevibacterium sp. R312. Par ailleurs, un vecteur navette a été créé en associant un plasmide extrait d'une souche de Lactobacillus bulgaricus et un plasmide d'Escherichia coli. L'unique site de restriction de ce dernier se trouve dans le gène de résistance à l'ampicilline, ce qui permet de sélectionner aisément les plasmides correctement ouverts. Le plasmide ainsi créé et baptisé pLE 16 comporte 7600 paires de base, véhicule une résistance au chloramphénicol (voir fig 15). La stabilité de Lactobacillus sp. 89 transformé par l'introduction de ce vecteur navette est relativement faible puisque seulement 50% des microorganismes de la 28ème génération présentent encore une résistance au chloramphénicol.

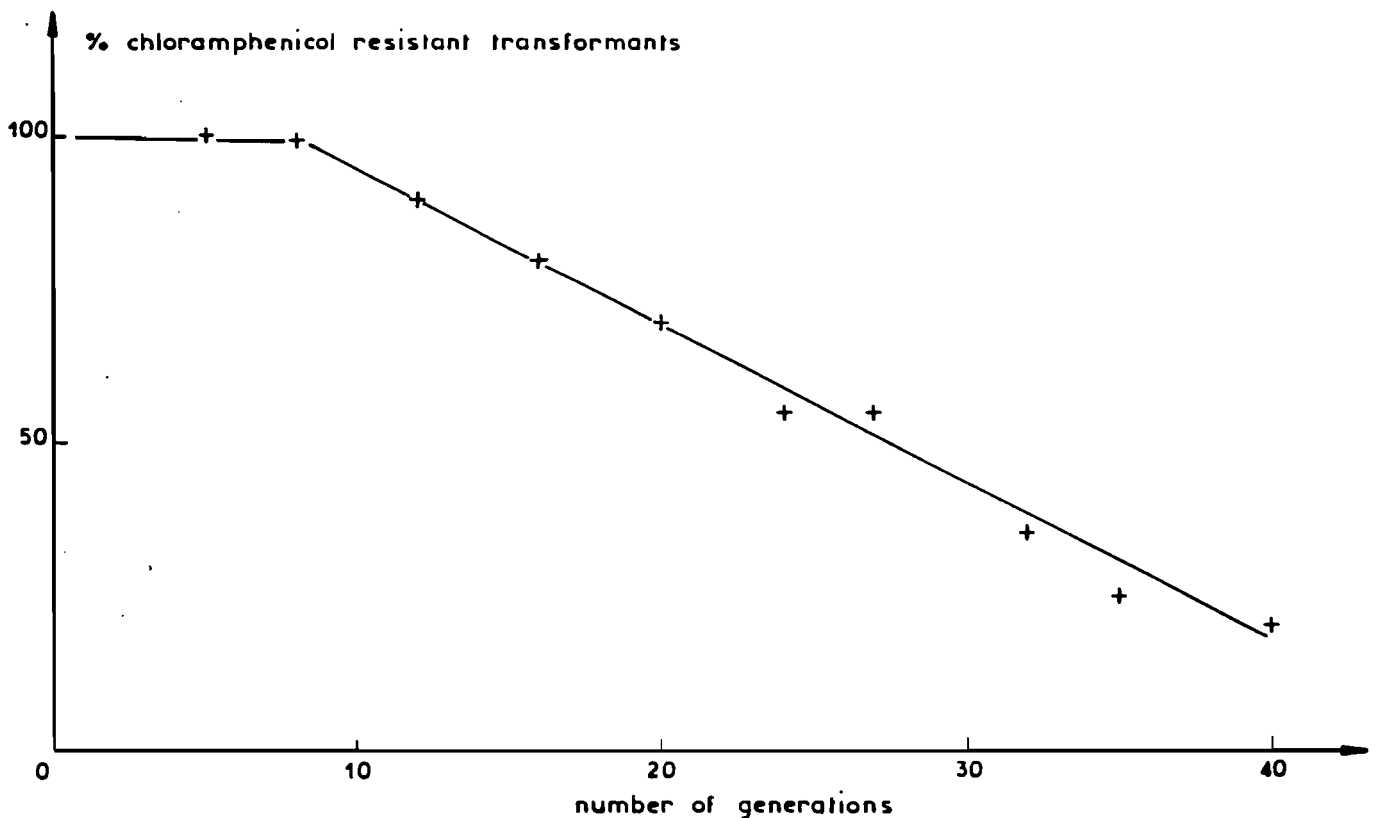


Figure 16 : stabilité du plasmide pLE 16 chez Lactobacillus sp. 89

L'ENSAM s'apprête à essayer le vecteur navette pLE 16 pour transférer les gènes de l'amidase générale et de la nitrile-hydratase, clonées chez Escherichia coli, à Lactobacillus sp. 89 puis à des Lactobacillus isolés dans des échantillons de manioc. En cas de succès, c'est à dire si ces gènes parviennent à s'exprimer dans la souche hôte, des essais de fermentation de manioc avec inoculation de Lactobacillus transformé pourraient être envisagés courant 91.

III-3 Définition et réalisation d'un fermenteur pilote de laboratoire (CEEMAT)

Le premier rôle que doit jouer ce nouvel appareil de laboratoire est de permettre de réaliser des suivis de fermentation de pulpe de manioc, en France, dans des conditions expérimentales correctes et confortables, c'est à dire :

- avec un dispositif de malaxage efficace mais n'engendrant que peu de contraintes de cisaillement dans la pulpe,
- avec de nombreuses possibilités de mesurer, réguler ou faire varier des paramètres (température, aération, brassage, pH du jus, vitesse de circulation du jus, pression de couverture, humidité du milieu),
- avec des dispositifs de renouvellement de l'atmosphère, d'introduction d'inoculum et de prise d'échantillons associant facilité d'utilisation et protection efficace vis à vis des contaminations extérieures.

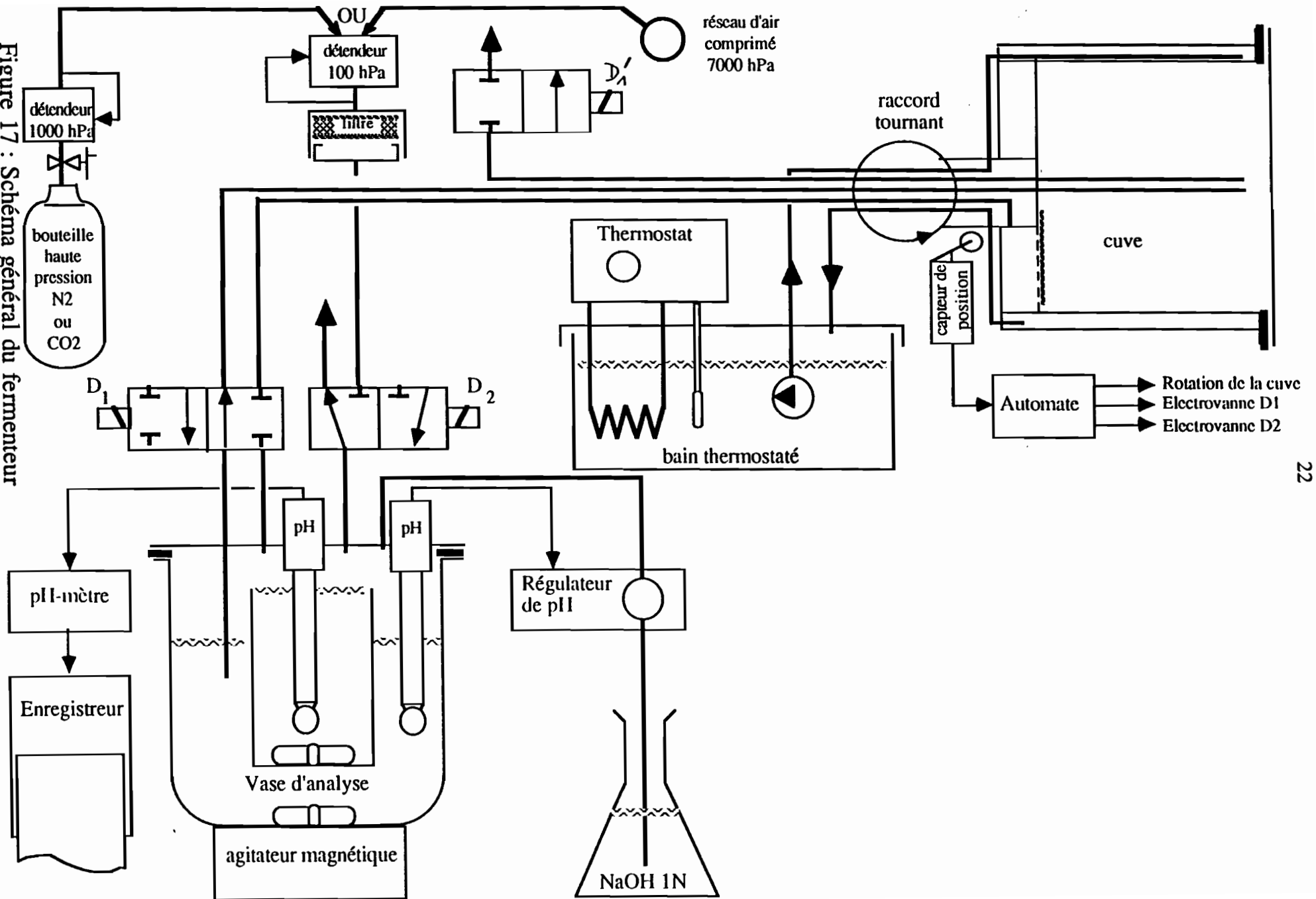
D'autre part, le projet de développement gagnerait un temps précieux si l'appareil pouvait déjà être préfiguratif d'un fermenteur industriel et constituer un banc d'essai de diverses solutions technologiques imaginées pour résoudre les problèmes notamment :

- de facilité de chargement, déchargement et nettoyage,
- de fiabilité, de rusticité, de simplicité d'entretien,
- de compatibilité de la motorisation avec les formes d'énergies disponibles en milieu rural africain,
- de compatibilité du prix avec les capacités d'investissement des unités de transformation semi-industrielles.

III-31 Définition du cahier des charges

- Système de malaxage type "bétonnière
- Vitesse de rotation : 5 à 10 tr•min⁻¹
- Inclinaison de l'axe : variable entre 10° à 30°.
- Maîtrise de l'aération par renouvellement périodique de l'atmosphère
- Volume utile : 15 litres de pulpe
- Régulation de la température par circuit d'eau en "double paroi"
- Circulation du jus : possibilité de mesure en continu et de régulation, circulation à l'abri de toute contamination, possibilité de réinjecter dans le fermenteur la totalité du jus extrait, débit minimum de circulation 1 litre/h.

Figure 17 : Schéma général du fermenteur



III-32 Fonctionnement du fermenteur

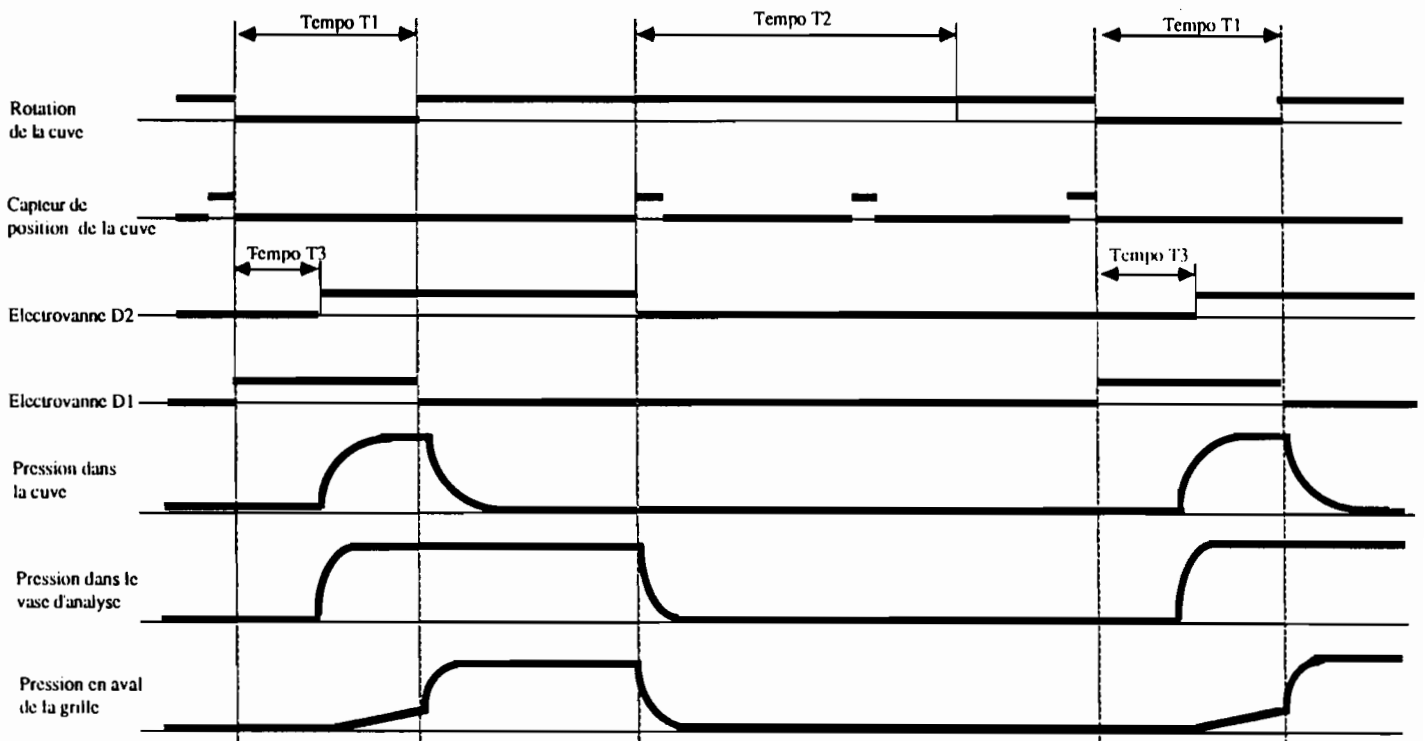


Figure 18 : Cycle automatique de fonctionnement du fermenteur

L'égouttage de la pulpe à travers un tamis doit être forcé par une différence de pression entre l'amont et l'aval du tamis de 100 hPa maximum. Le taux de remplissage nominal garantit qu'approximativement la moitié du fond de la cuve se trouve sous le niveau de la pulpe. Le tamis occupe seulement un secteur du fond du fermenteur. Le jus récupéré dans le "caisson" en aval du tamis ne peut s'écouler par gravité jusqu'au circuit d'analyse que lorsque ce caisson atteint la position haute au cours de la rotation de la cuve du fermenteur. Dans la zone en amont de la grille, c'est à dire la partie contenant la pulpe, une pression de couverture peut être appliquée (100 hPa maximum). Un automatisme réalisé en "logique câblée à contact" assure le cycle de fonctionnement suivant :

- 1 cuve arrêtée (grille en position basse), essorage de la pulpe contre la grille par application d'une pression de couverture (temporisation T1 — temporisation T3)
 - 2 premier tour lors de la remise en rotation de la cuve, décolmattage de la grille par envoi de gaz par l'arrière de la grille
 - 3 tours suivants, vidange du "caisson aval" par gravité jusque dans le réacteur d'analyse (temporisation T2 + fraction de tour de façon à arrêter la cuve avec la grille en position basse)
 - 4 cuve arrêtée (grille en position basse), redescende de la pulpe et obstruction complète de la grille (temporisation T3)
 - 5 cuve arrêtée, réinjection du jus analysé dans la cuve du fermenteur.
- Bouclage sur l'étape 1

III-4 Recherche d'une optimisation du procédé naturel de détoxification (CEEMAT)

III-41 Observation de l'influence de la maîtrise du pH de la pulpe de manioc, de son aération et du drainage des jus d'égouttage, sur la cinétique de fermentation/détoxification.

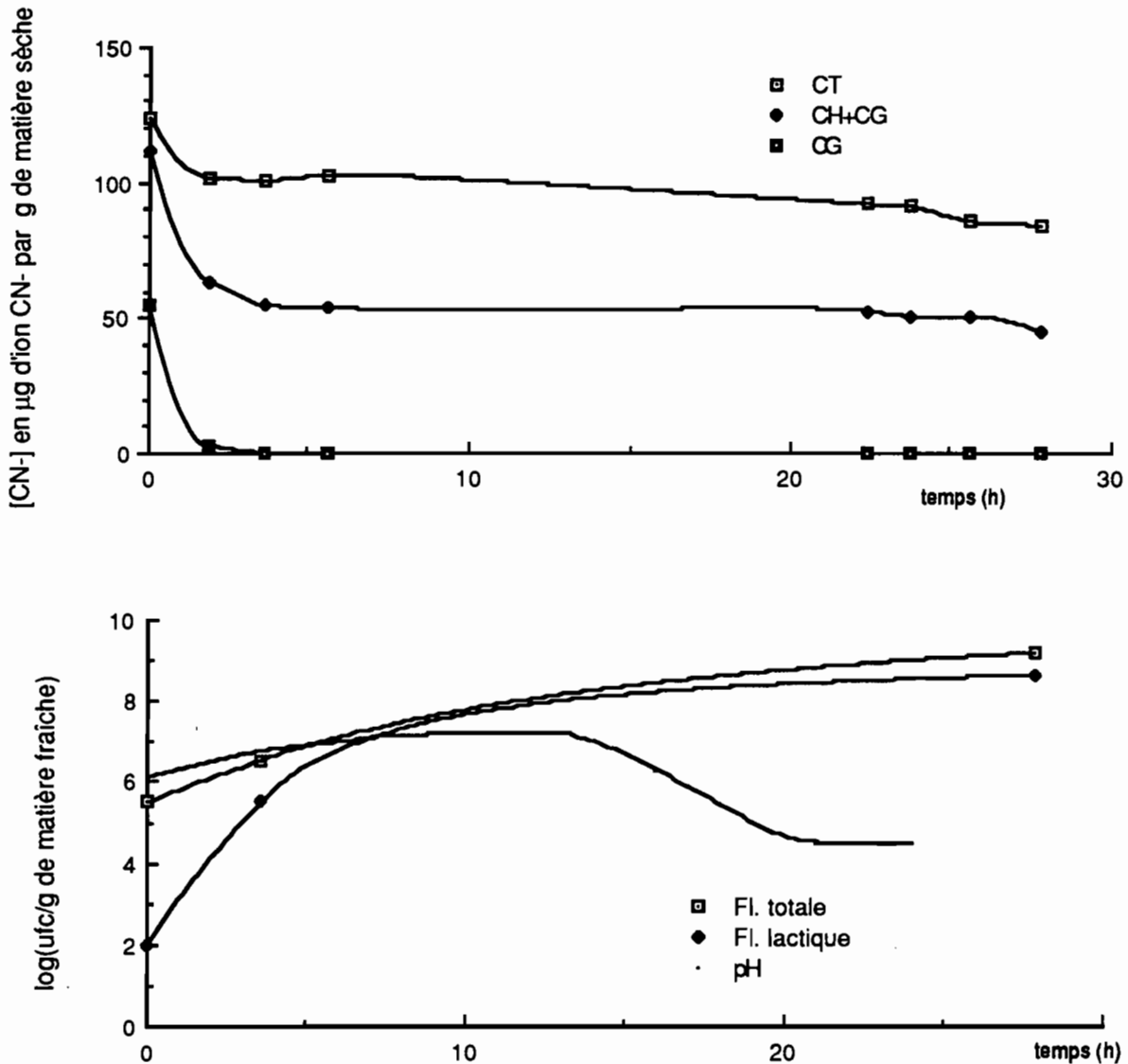


Figure 19 : Fermentation de 15 kg de pulpe de manioc, avec régulation du jus à pH 7 pendant 12 heures

La dégradation des cyanoglucosides, sous l'effet de la linamarase endogène, est totale au bout de 4 heures mais les cyanhydrines formées sont stables

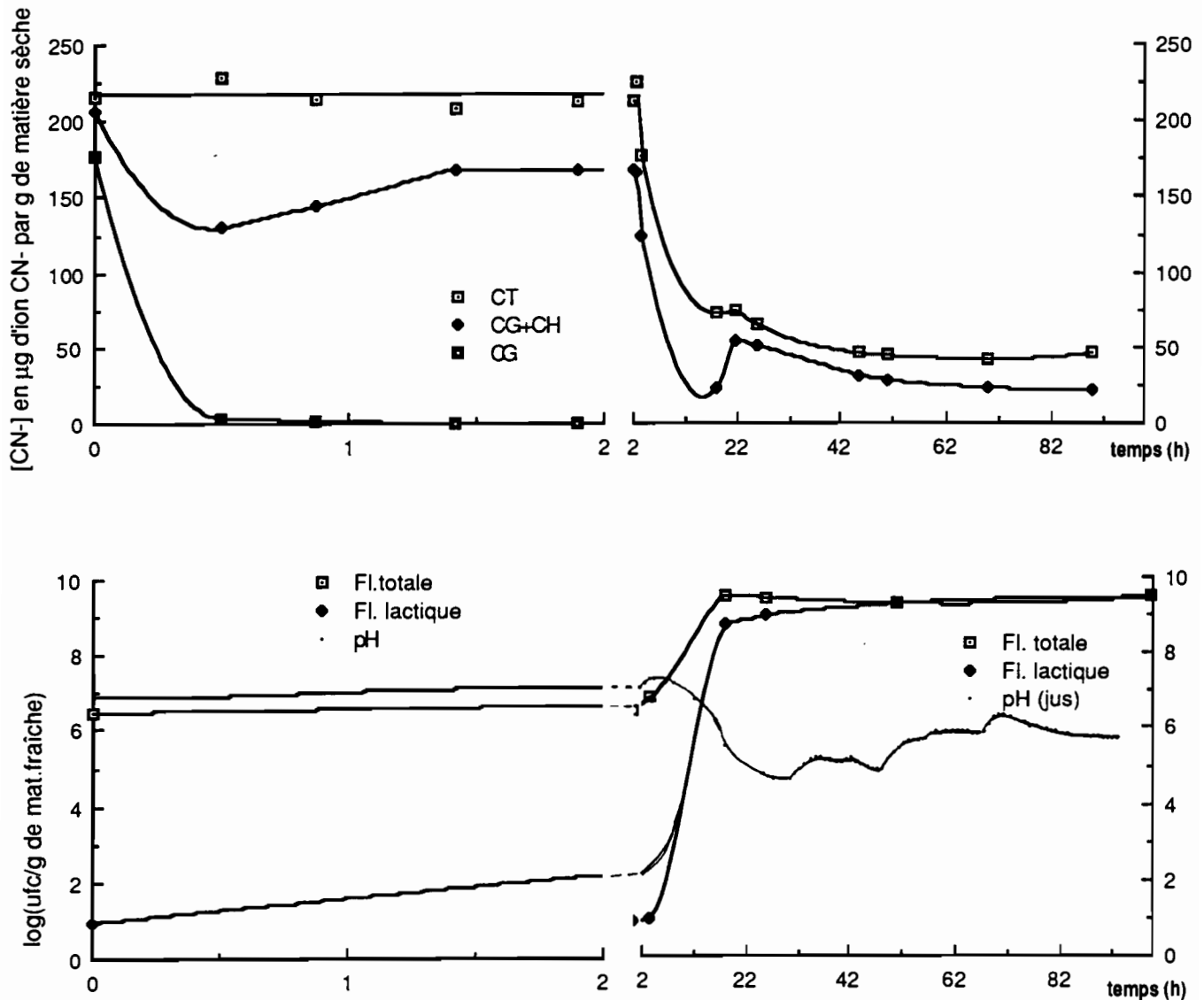


Figure 20 : Fermentation de 15 kg de pulpe de manioc, avec oscillation de la consigne de pH

Cet essai permet de confirmer la réversibilité de la réaction d'hydrolyse des cyanhydrines en acide cyanhydrique. Dans les phases où le pH est élevé, le rapport Cyanhydrines/HCN est voisin de 1. Lorsque le pH descend, une partie des cyanhydrine se retransforme en HCN et le rapport monte jusqu'à 2,5.

III-42 Définition d'un protocole de conduite de la fermentation et des équipements nécessaires

De toutes les observations réalisées, il ressort que le brassage de la pulpe semble améliorer notablement la vitesse de dégradation des cyanoglucosides, vraisemblablement grâce à un meilleur contact de la linamarase endogène du manioc avec son substrat. Le facteur limitant de la détoxification se révèle être la faiblesse de l'évacuation de l'acide cyanhydrique qui se forme à une vitesse importante au début de la fermentation, tant que le pH est au dessus de 6,5, et qui est susceptible de reformer des cyanhydrines dès que le pH descend. Il paraît donc nécessaire, pendant la première phase de la fermentation, de laisser s'égoutter le plus de jus possible. Afin de limiter les pertes d'amidon, ce jus pourrait être débarrassé de son cyanure libre (voire également des cétones) par une aération intense à pH bas (voisin de pH4) puis neutralisé (à environ pH7) et réinjecté sur la pulpe. Cette circulation du jus, associée à un brassage permanent de la pulpe, devrait être assurée pendant 2 heures puisque ce délai semble suffisant pour la dégradation de tous les cyanoglucosides. Ensuite un "starter lactique" pourra être inoculé dans la pulpe pour que la fermentation puisse démarrer rapidement.

Ce procédé sera très prochainement mis à l'épreuve, au CEEMAT, d'abord en fermenteur pilote, puis lors de fermentations en bacs ajourés à ciel ouvert, selon la technologie couramment utilisée dans l'unité expérimentale de Davié. Dans ce cas, le brassage de la pulpe sera exécuté à la main. Le starter lactique sera préalablement obtenu par culture sur amidon d'une souche sélectionnée pour son activité amylasique. Cette culture sera utilisée tel quel, sans séparation de la biomasse et pourra donc recueillir le jus de fermentation, l'acidifier et l'utiliser pour se maintenir en phase exponentielle de croissance.

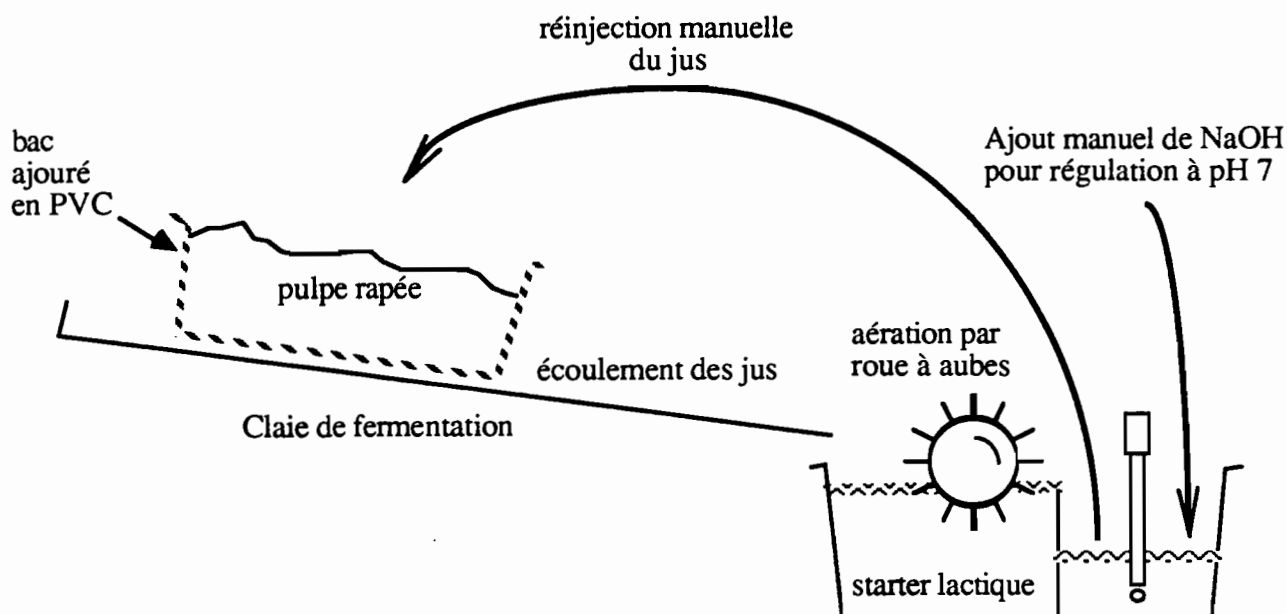


Figure 21 : Procédé de fermentation qui sera prochainement transféré à l'unité expérimentale de Davié

IV- Conclusions et Perspectives

Les deux voies imaginées initialement pour améliorer la détoxification de la pulpe de manioc râpée apparaissent viables.

La solution par maîtrise du pH devrait pouvoir être mise en œuvre, prochainement, sur l'unité de Davié car seule l'expérimentation à l'échelle semi-industrielle permettra de lever les incertitudes qui subsistent quant aux risques de contaminations par des souches indésirables et aux caractéristiques organoleptiques du produit fini. Cependant, ce transfert en région chaude nécessite encore quelques essais en laboratoire afin de préciser le protocole de conduite de la fermentation. Ce processus, bien que particulièrement simple dans son principe, exigera pourtant plusieurs interventions d'opérateurs au cours de la fermentation. L'équipement (bacs en plastique, claies de fermentation avec collecte des jus d'égouttage), les "intrants" (soude) et les matières consommables d'analyse (indicateurs de pH), le niveau de qualification des opérateurs et le coût de leurs interventions affecteront inévitablement le prix de revient du gari.

L'alternative qu'offrirait une souche lactique produisant des enzymes à activités "cyanolytiques" et parvenant à se maintenir dans le "pied de cuve" dans chaque unité de production où elle aurait été introduite, reste donc particulièrement intéressante. En effet, la mise en œuvre d'un tel procédé n'exigerait aucune modification des équipements ni aucune intervention au cours de la fermentation. La poursuite des recherches en vue de créer, par génie génétique, cette bactérie peut donc toujours être considérée comme pertinente. Il est par contre à signaler que des problèmes de "protection industrielle" d'une telle souche pourraient bientôt apparaître.

Le CEEMAT s'est vu confier, en septembre 1989, par la Communauté Economique Européenne, la maîtrise d'œuvre d'un projet intitulé "Amélioration de la qualité des aliments fermentés à base de manioc". Grâce au financement de ce projet, la poursuite des travaux engagés sur l'optimisation des mécanismes de détoxification pourra donc être assurée partiellement. Le transfert sur le site de Davié du protocole de conduite de la fermentation par contrôle du pH devrait pouvoir être réalisé au cours de l'année 1991, en collaboration avec l'INPT. Les essais d'évaluation des potentialités de détoxification de la souche Brevibacterium sp. R312 en milieu pâteux seront également exécutés en 1991 au CEEMAT, de même que les travaux de génie génétique seront poursuivis par l'ENSA-M. Les fonds que ce projet CEE permet de consacrer à ces recherches apparaissent cependant nettement insuffisants pour couvrir le champ immense s'étendant du génie génétique jusqu'au transfert industriel, accompagné de mesures de protections juridiques (brevets) et d'une promotion commerciale du produit fini sur les marchés locaux et export. Une requête sera donc prochainement formulée auprès de différents bailleurs de fonds potentiels.

Il est enfin à signaler que le CEEMAT continuera, au moins au cours des deux années à venir, à travailler sur l'optimisation de l'ensemble du processus de transformation du manioc en gari et notamment sur les possibilités de mécanisation des phases d'épluchage et de cuisson.

V - Publications et communications dans le cadre du présent contrat

- Arnaud, A.; Galzy, P.; 1989. Biological hydrolysis of nitriles and amides : Biotechnological applications. *Revista Latinoamericana de Química (MEX)*, (sous presse)
- Bernet, N.; 1989. Amélioration génétique d'une souche de Brevibacterium sp. à activité nitrilasique et amidasique et mise au point d'un réacteur de bioconversion. Thèse de docteur ingénieur ENSAM, Montpellier (F)
- Bernet, N.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1990. Optimization of culture conditions of Brevibacterium sp. R312 for production of nitrile hydratase. *Biocatalysis*, **3**, 259-267
- Chagnaud, P.; Chian Kwo Chion, C.K.N.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1990. Construction of a new vector shuttle for Lactobacillus. 6th International Symposium on the Genetics of the industrial microorganisms. 12-18 august 1990, Strasbourg (F)
- Chagnaud, P.; Chian Kwo Chion, C.K.N.; Duran, R.; Naouri, P.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1990. Construction of a new vector shuttle for Lactobacillus. (à paraître)
- Chuzel, G.; 1989. Etude des traitements technologiques intervenant lors de la transformation du manioc en gari, Thèse, ENSA, Montpellier (F)
- Ekué, G.; 1989. Essais d'équipement de l'unité de transformation du manioc de Davié, Rapport de stage, ENSIA, Massy (F), Doc CEEMAT
- Igbeka, J.C.; Jory, M.; Griffon, D.; 1990. Proposition of machines for the selective mechanization of gari processing. *Agricultural mechanization in Asia, Africa and Latin America (A.M.A.)*, Tokyo (JAP), (à paraître)
- Jory, M.; 1989. Contribution à l'étude de deux processus de transformation du manioc comportant une phase de fermentation : Le gari au Togo et l'amidon aigre en Colombie. Mémoire de Mastère ENSIA, Massy (F)
- Kaaked, M.R.; Legras, J.L.; Duran, R.; Chian Kwo Chion, C.K.N.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1990. Purification and properties of the nitrile hydratase of a new strain of Rhodococcus sp. (à paraître)
- Legras, J.L.; 1990. Etude des voies de dégradation des cyanoglucosides d'une souche de Brevibacterium sp. R312 : Application à la détoxification du manioc. Thèse de docteur ingénieur ENSAM, Montpellier (F)
- Legras, J.L.; Chuzel, G.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1989. Natural nitriles and their metabolism. *World Journal of Microbiology and biotechnology (incorporating MIRCEN Journal)* (GB), (sous presse)
- Legras, J.L.; Jory, M.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1990. Detoxification of cassava pulp using Brevibacterium sp. R312. *J. Applied Microbiology and Biotechnology (RFA)*, **33** : 529-533
- Legras, J.L.; Kaaked, M.R.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1989. Purification and properties of the β -glucosidase from a nitrile hydratase producing Brevibacterium sp. strain R312. *J. Basic Microbiology (RDA)* **29** 10, 665-669
- Legras, J.L.; Kaaked, M.R.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1989. Degradation of cyanoglucosides by Brevibacterium sp. R312 strain. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **35**, 451-461
- Monroy, J.A.; Lebert, A.; Marty, C.; Muchnik, J.; Bimbenet, J.J.; 1990. Simulation of cyanoglucosidic compounds elimination in cassava during drying. Communication at International Drying Symposium, August 1990, Prague (TCH)
- Moreau, J.L.; Bernet, N.; Chian Kwo Chion, C.K.N.; Duran, R.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1990. Optimization of conditions for the production of nitrile hydratase : Application of nitrile

hydratase and amidases of Brevibacterium. The industrial applications of natural, modified and artificial enzymes, International Conference 23-29 sept. 1990, Pisa (I)

Vasserot, Y.; Chemardin, P.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1989. Evidence for the β -glucosidase activity and cellobiose fermentation by various Kloeckera strains. Acta Biotechnologica (RDA) (sous presse)

Vasserot, Y.; Christiaens, H.; Chemardin, P.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1989. Purifications and properties of a β -glucosidase of Hanseniaspora vineae Van der Walt and Tscheuschner with the view to its utilization in fruit aroma liberation. J. Appl. Bacteriol. (GB), 66, 271-279

Références

Bui, K.; Fradet, H.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1984. A nitrile hydratase with a wide substrate spectrum produced by a Brevibacterium sp. . Journal of General Microbiology, 130, 89-93

Bui, K.; Maestracci, M.; Thiery, A.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1984. A note on the enzymic action and biosynthesis of a nitrile hydratase from a Brevibacterium sp. . Journal of Applied Bacteriology, 57, 183-190

Butler, G.W.; 1965. The distribution of the cyanoglucosides linamarine and lotaustraline in higher plants. Phytochemistry, 1965, 4, 127-131

Chuzel, G.; Griffon, D.; 1987. Le gari : un produit traditionnel fermenté à base de manioc. Aspects fermentation - détoxification., Doc. CEEMAT

Jory, M.; 1987. Transformation du manioc en gari au Togo. Rapport de stage ENSIA, Massy (F), Doc CEEMAT

Maestracci, M.; 1985. Etude de l'amidase générale (acylamide amidohydrolase E.C.3514) de Brevibacterium sp.: Essai de clonage du gène responsable de la synthèse de cette enzyme. Thèse de doctorat de 3ème cycle en Sciences Alimentaires. U.S.T.L. Montpellier (F)

Maestracci, M.; Thiery, A.; Bui, K.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1986. Activity and regulation of an amidase (acylamide amidohydrolase E.C.3514) with a wide substrate spectrum from Brevibacterium sp. Archives of Microbiology, 138, 315-320

Nambisan, B.; Sundaresan, S.; 1984. Plant toxins. Spectrophotometric determination of cyanoglucosides in cassava. Journal of the Association for Analytical Chemistry, 67, 641-643

Sykes, A.H.; 1981. Early studies on the toxicology of cyanide. in Cyanide in biology. (Vennesland, B.; Conn, E.E.; Knowless, C.J.; Westley, J.; Wissing, F.; Eds), pp 1-10. Academic Press, London (GB)

RAPPORT SUR LES TRAVAUX EFFECTUES AU CONGO

DANS LE CADRE DU PROGRAMME

"AMELIORATION DES MECANISMES DE DETOXICATION DU MANIOC

LORS DES PHASES DE FERMENTATION"

(APPEL D'OFFRES MRES/MINCOOP "PRODUCTIONS ALIMENTAIRES TROPICALES" 1988)

OPERATION 2

Influence des différentes techniques de rouissage sur la microflore lactique et sur la valeur nutritionnelle d'aliments traditionnels dérivés du manioc.

RAPPEL DES OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

- Caractérisation des processus physiques, chimiques et biologiques intervenant à l'occasion de différentes modalités de rouissage en usage en Afrique centrale.
- Connaissance du rôle des microorganismes, notamment de la microflore lactique, au cours de la phase de rouissage.
- Etude de l'influence des modalités de rouissage sur:
 - . l'évolution des teneurs des racines en composés cyanés et en acides gras volatils.
 - . la valeur nutritionnelle et les caractéristiques organoleptiques des produits dérivés (foufou, chikwangu).

CALENDRIER DE TRAVAIL

Le programme a effectivement débuté courant janvier 89 au moment de l'affectation de S. TRECHE au Centre ORSTOM de Brazzaville; en janvier et février ont été pris les contacts avec les partenaires basés à Brazzaville, choisis les modalités de rouissage à étudier et élaborés les protocoles de travail.

Les travaux se sont déroulés sans discontinuité de mars 1989 à septembre 1990 à partir de quatre séries d'essais dont la réalisation a été largement dépendante des disponibilités en matériels et en personnel aux différentes périodes.

La halle de technologie et l'unité d'évaluation sensorielle d'Agricongo ont été immédiatement opérationnelles et ont permis un bon déroulement des essais proprement dits et des tests organoleptiques.

En revanche, compte tenu des pannes ayant affecté le matériel préexistant et les retards dans les livraisons des commandes, aucune analyse microbiologique n'a pu être effectuée en 1989 et la lyophilisation des échantillons prélevés pour détermination des teneurs en nutriments n'a pu commencer qu'au cours de l'été 1990.

Pendant toute l'année 1989, les seuls équipements de laboratoire disponibles à Brazzaville ont été ceux nécessaires au dosage des composés cyanés et à la détermination du pH et de l'acidité totale; le dosage des acides gras volatils a été réalisé au Laboratoire de Physiologie et Métabolisme Cellulaires du Centre Orstom de Montpellier. En revanche, en 1990 la disponibilité d'un chromatographe en phase gazeuse et la participation effective de chercheurs congolais du laboratoire de Microbiologie du centre Orstom et du laboratoire de Biotechnologie de la faculté des sciences de Brazzaville ont permis de réaliser de façon simultanée l'ensemble des mesures prévues à Brazzaville (seul le dosage HPLC des AGV s'est effectué à Montpellier).

Une mission effectuée par A. BRAUMAN, microbiologiste de l'Orstom affecté au programme, a permis de recueillir des échantillons bien référencés qu'il a utilisés ultérieurement pour une étude microbiologique et biochimique au LPMC du Centre Orstom de Montpellier et au Laboratoire d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif du Centre INRA de Jouy-en-josas.

La première série d'essais effectuée de Mars à septembre 1989 a permis d'étudier l'influence du milieu de rouissage et de l'épluchage préalable des racines sur:

- l'évolution au cours du rouissage:
 - . du poids et de la teneur en eau des racines;
 - . de quelques paramètres physico-chimiques (T°, pH);
 - . des teneurs en composés cyanés, en acides totaux, en acide lactique, en acides gras volatils;
- les bilans massiques des transformations en farine et chikwanges;
- les qualités organoleptiques des produits finis (foufou, chikwange).

La seconde série d'essais effectuée en octobre et novembre 1989, à une période où il n'a pas été possible d'effectuer d'analyses de laboratoire, a permis d'étudier l'influence de la variété et de l'épluchage préalable des racines dans le cas de rouissage dans l'eau (bacs en ciment) sur:

- la durée de l'épluchage;
- les bilans massiques par rapport à la matière fraîche et à la matière sèche des transformations en foufou et chikwanges;
- le pH, l'acidité, la teneur en cyanures totaux et les teneurs en quelques composants (protéines, fibres, cendres) des farines;
- les qualités organoleptiques des produits finis (foufou, chikwange).

Une série d'essais méthodologiques réalisée de Janvier à Mars 1990 a permis d'évaluer la variabilité intra et inter-fûts des mesures dans le cas de rouissages en fûts en plastique rigide.

La troisième et dernière série d'essais effectuée de mars à juin 1990 a permis de préciser l'influence de l'épluchage préalable des racines dans le cas de rouissage dans l'eau (fût en plastique) et à sec (sac plastique opaque) sur:

- l'évolution en fonction de la durée de rouissage:
 - . du poids et de la teneur en eau des racines;
 - . de quelques paramètres physicochimiques (T°, pH, O₂ dissous);
 - . des teneurs en composés cyanés, en acides totaux, en acide lactique, en acides gras volatils;
 - . de la microflore totale, de la microflore lactique et des populations bactériennes ayant des activités amylolytiques, cellulolytiques, pectinolytiques et β -galactosidasiques;
 - les bilans massiques des transformations en foufou et chikwanges;
 - le pH, l'acidité et les teneurs en cyanures totaux des farines;
 - les qualités organoleptiques des produits finis (foufou, chikouange).
-

CHOIX DES MODALITES DE ROUISSAGE ETUDIEES

Les études préliminaires effectuées par les partenaires Brazzavillois du programme (AGRICONGO, LERPAN) et confirmées par les résultats de l'enquête que nous avons menée sur l'ensemble des zones rurales du pays pendant l'été 1989 dans le cadre du programme financé par la CEE ont révélé qu'il existait au Congo une grande diversité dans les modalités de rouissage en fonction, d'une part, des contraintes écologiques et topographiques (disponibilité de l'eau, éloignement des points d'eau, température ambiante) et, d'autre part, de facteurs socio-culturels (procédés spécifiques à certains groupes ethniques) et socio-économiques (commercialisation ou non des produits dérivés, conditions particulières liées à l'urbanisation).

Par ailleurs, un certain nombre d'innovations proposées depuis quelques années par Agricongo et par le Complexe Agro-industriel de Mantsoumba pour des unités de production industrielles ou coopératives (rouissage en bacs en ciment; rouissage à sec en sac plastique) nous sont apparues suffisamment intéressantes pour faire l'objet d'études particulières.

Dans les pratiques traditionnelles, les modalités de rouissage se différencient essentiellement au niveau du milieu de rouissage et par le fait que les racines sont épluchées ou non avant l'immersion dans l'eau.

Principalement en fonction des disponibilités en eau, les racines sont rouies, soit, dans de petits étangs, encore appelés marigots, généralement réservés à cet effet, soit en bordure de rivières aménagées de telle manière que les racines ne soient pas emportées par le courant, soit, dans des récipients divers (marmite, fût en fer ou en plastique...). Dans la région des plateaux, en raison de la rareté de l'eau, les racines non épluchées sont rouies dans des trous aménagés dans le sol après avoir été compactées dans de la terre humide.

Le fait d'éplucher ou non les racines avant rouissage dépend essentiellement des habitudes technologiques et de la plus ou moins grande facilité d'épluchage des variétés utilisées.

La durée de rouissage est dépendante de l'appréciation faite par les transformateurs de l'état de ramollissement des racines et de leur utilisation ultérieure: chikwanges, racines rouies et cuites, fufufous réalisés à partir de cossettes ou de racines émottées (cf annexe 1). Les transformateurs traditionnels perçoivent très nettement que la vitesse d'apparition du ramollissement est très largement dépendante de la température ambiante: un même état de ramollissement peut-être obtenu après 3 ou 8 jours en fonction de la saison.

Les innovations proposées dans l'optique industrielle ou semi-industrielle ont pour objectifs, d'une part, la rationalisation des unités de production et la standardisation des conditions de rouissage dans le cas des bacs en ciment, d'autre part, l'économie de l'eau dans le cas du rouissage en sac plastique imperméable.

En fonction de ce qu'il précède, il a donc été décidé:

- dans premier temps (1ère série d'essais) de comparer l'évolution de rouissages effectués dans différents milieux (étang, rivière, fût, bac en ciment, sac plastique) pour des racines ayant subi ou non un épluchage préalable.
- dans un second temps (2ème série d'essais) et selon des protocoles simplifiés, d'étudier les effets et les interactions de la variété et de l'épluchage préalable des racines sur le rendement et la pénibilité des transformations et sur la qualité des produits finis.

- dans un troisième temps (3ème série d'essais), après une série de deux essais méthodologiques visant à estimer l'importance relative de différentes sources de variabilité des mesures, de mener une étude plus approfondie de l'influence de l'épluchage préalable pour des milieux de rouissage plus facilement standardisables (eau de pluie dans des fûts en plastique; sac plastique imperméable).

A noter qu'un certain nombre de facteurs de variation potentiels comme l'état physiologique et la taille des racines et la température de rouissage n'ont pas fait l'objet d'expérimentation; néanmoins, dans chaque essai des précautions ont été prises pour limiter les interférences possibles avec les facteurs étudiés: calibrage des racines, utilisation de racines saines d'âge et de durée de conservation identiques; rouissages simultanés dans des endroits les plus rapprochés possibles pour limiter les écarts de température...

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels utilisés.

1.1. Les racines.

Pour chaque essai, les racines utilisées provenaient de lots homogènes et dûment et répertoriés en ce qui concerne la nature de la variété, les conditions de culture et l'âge à la récolte.

Les variétés les plus utilisées ont été PEMBE, largement répandue dans la région de Brazzaville, et NGANSA, actuellement vulgarisées en raison de ses avantages agronomiques. Dans les essais intervariétaux, 8 autres variétés issues des programmes de sélection ont été comparées: MOUDOUNA, ZANAGA 2, DIKONDA, F100, 42M8, TMS30507, MBOUKI, LOUENDA.

Sauf pour un des essais intervariétaux, la culture a été effectuée selon les techniques traditionnelles sur la station d'AGRICONGO de Kombé (17 km de Brazzaville) ou dans la zone de plateaux située 45 km au nord de Brazzaville. Les racines utilisées dans l'essai comparatif de huit variétés provenaient des champs expérimentaux du projet FAC manioc à Mantsoumba (culture semi-mécanisée).

Les racines ont été récoltées de 18 à 24 mois après la plantation sauf dans l'essai intervariétal de Mantsoumba (12 mois).

Dans la plupart des essais, les effets de l'épluchage préalable des racines ont été étudiés en mettant à rouir dans des conditions identiques des racines épluchées et des racines non épluchées provenant de mêmes lots de racines.

2.2. Les installations de rouissage.

Six milieux de rouissage ont été utilisés au cours des différents essais:

- rouissage en eau stagnante dans de petites mares (10 à 30m²) habituellement utilisées à cet effet;
- rouissage dans l'eau courante en bordure d'une rivière de 5 m de large;
- rouissage dans des fûts en fer contenant environ 0,4 m³ d'eau de pluie;
- rouissage dans des fûts en plastique rigide contenant environ 0,3 m³ d'eau de pluie;
- rouissage dans des bacs en ciment contenant de 2 à 10 m³ d'eau de pluie ou de puit;
- rouissage dans des sacs imperméables en plastique (85 x 50 cm) ne contenant pas d'eau.

RACINES Fraichement récoltées

Triage - Nettoyage

Epluchage Rouissage
Rouissage Epluchage

RACINES ROUIES EPLUCHEES

Défilbrage grossier

Ecrasement

Egouttage

(stockage)

Défilbrage fin au peigne

Défilbrage fin par décantation

Egouttage

Cuisson

Mise en boules Mise en cossettes Emottage

Séchage au soleil Fumage

(Défilbrage)

Broyage

Tamissage

FARINE A FOUFOU

Stockage

Foufou

Pilonnage

Modelage

Emballage

Cuisson

Moussombo
Mondembé
Mougingui
Mbanda
Ongora
.....

Malaxage

Modelage

Précuisson

Malaxage

Modelage

Emballage

Cuisson

Ngudi-Yaka
Fabriqué
Moungouélé
.....

Pilonnage

Ebouka
.....

Ntuka Tchikedi
.....

ANNEXE 1

PRINCIPALES TRANSFORMATIONS TRADITIONNELLES DES RACINES DE MANIOC AU CONGO
(Programme: "Etude et amélioration des modalités d'utilisation du manioc"
ORSTOM/DGRST/FACULTE DES SCIENCES)

2. Dispositifs expérimentaux.

2.1. Modalités communes de mise en place des essais.

Les modalités décrites sont celles utilisées pour les essais au cours desquels l'ensemble des mesures ultérieurement détaillées ont été réalisées; dans plusieurs essais, lorsque les objectifs étaient limités, ces modalités ont été simplifiées.

Pour chaque essai et pour chaque variante étudiée, 4 lots de racines ont été formés en veillant à ce qu'ils soient constitués d'un même nombre de racines de petit, moyen et gros calibres (avant la constitution des lots, les racines étaient lavées et réparties en trois tas en fonction de leur calibre).

Le Lot N°1 était composé de 12 racines (3 de chaque calibre): après épluchage, les racines étaient utilisées pour la prise d'échantillon correspondant au témoin avant rouissage.

Le lot N°2 servait au prélèvement des échantillons pour analyses biochimiques et, éventuellement, microbiologiques: 48 racines (16 de chaque calibre) sont étiquetées, pesées individuellement, éventuellement épluchées et repesées, et mises à rouir selon les modalités correspondant à la variante de l'essai. Sauf pour les essais en fûts ou en sacs plastique imperméables, les racines étaient placées dans des sacs en textile synthétique perméable pour permettre une récupération plus aisée des racines en cours de rouissage.

Les lots N°3 et 4 (environ 20 kg chacun) étaient pesés globalement et mis à rouir séparément dans les mêmes conditions que le lot N°2.

2.2. Dispositifs particuliers à chaque essai.

2.2.1. Essais méthodologiques.

- ESSAI M1: Etude de la variabilité "Intra-fût".
Les mesures ont été réalisées sur 3 lots comparables de 6 racines rouies simultanément dans un même fût.
- ESSAI M2: Etude de la variabilité "Inter-fût".
Les mesures ont été réalisées sur 4 lots comparables de 6 racines rouies simultanément dans 4 fûts identiques placés côte à côte.

2.2.2. Première série d'essais.

La première série a comporté 3 essais au cours desquels ont été comparés, à partir de prélèvements constitués de lots de 6 racines pour chaque traitement à chaque durée de rouissage considérée, les effets de différentes installations de rouissage.

- ESSAI 1A: * racines non épluchées en:
 - . rivière (eau courante);
 - . étang (eau stagnante);
 - . fûts en fer;
 - . bacs en ciment.* racines rapées en sac plastique
- ESSAI 1B: Influence, lors d'un rouissage en sac, de l'ensemencement par un jus de rouissage précédent (25ml/kg) en fonction de l'état des racines:
 - racines entières non épluchées;
 - racines entières épluchées;
 - racines épluchées découpées en morceaux (10 à 30 cm3)

- ESSAI 1C: Effet de l'épluchage préalable des racines dans le cas de rouissage en:
 - étang (eau stagnante);
 - bacs en ciment.

2.2.3. Seconde série d'essais.

Trois essais intervariétaux ont permis d'étudier l'influence de l'épluchage préalable des racines en fonction de la variété dans le cas de rouissage en bacs en ciment.

- ESSAI 2A: Variétés Mpembé, Ngansa, Mbouaki et Louenda.
- ESSAI 2B: Variétés MPEMBE, NGANSA, MOUDOUNA, ZANAGA 2, DIKONDA, F100, 42M8, TMS30507.

2.2.4. Troisième série d'essais.

Cette troisième série d'essais effectués avec des racines de la variété Ngansa, récoltées après 24 mois, a consisté en l'étude de l'influence de l'épluchage préalable des racines dans le cas de rouissage en fût plastique et en sac plastique imperméable.

- ESSAI 3A: Effet de l'épluchage préalable des racines au cours d'un rouissage en fût plastique
- ESSAI 3B: Effet de l'épluchage préalable des racines au cours d'un rouissage à sec en sac plastique imperméable.

3. Mesure des paramètres physiques.

Au premier jour, avant et après l'immersion des racines, et chaque jour juste avant le prélèvement d'échantillon, le pH, la température et l'oxygène dissous sont mesurés dans un bécher contenant de l'eau prélevée à proximité immédiate des racines en cours de rouissage.

4. Prélèvements et conditionnements des échantillons:

4.1. Prélèvements

Pour chaque variante des essais, le jour du début de rouissage (échantillon témoin) et quotidiennement pendant toute la durée du rouissage (sauf pour les rouissages à sec en sac plastique où les prélèvements sont faits tous les 5 à 7 jours), différentes prises d'essai sont effectuées à partir d'un échantillon réalisé à partir de 12 (témoin) ou de 6 racines (racines mises à rouir) comportant un nombre égal de racines de chaque calibre.

Les racines rouies utilisées à chaque échantillonnage sont tirées au sort, lavées dans l'eau de rouissage (sauf dans le cas des rouissages à sec), égouttées de manière standard (10 mn sur un grillage), pesées individuellement et, éventuellement, épluchées et repesées lorsqu'elles ont été mises à rouir non épluchées).

L'ensemble des 12 ou 6 racines correspondant à un échantillon est ensuite découpé en petit dès (0.5 mm) sur une paillasse préalablement nettoyée à l'alcool; les différentes prises d'essais sont ensuite effectuées parmi les petits dès soigneusement mélangés.

- (a) EN TRIPLE: environ 30g dans une coupelle en aluminium pour détermination de la teneur en matière sèche par dessiccation en étuve à 105°C pendant 48h.
- (b) EN DOUBLE: 80g dans un pot en plastique contenant 100ml H3PO4 0,1M pour dosage des composés cyanés et des AGV par CPG.
- (c) EN SIMPLE: environ 300g dans un sac plastique pour différentes analyses.
- (d) EN SIMPLE: 300g pour détermination du pH et de l'acidité.
- (e) EN SIMPLE: 400g pour analyses microbiologiques et dosage des AGV par HPLC.

Des prises d'essai sont également effectuées selon les mêmes principes dans les pâtes après défibrage et égouttage et dans les produits finis (chikwangu, fofou).

4.2. Extraction en vue du dosage des composés cyanés et des acides gras volatils par CPG.

Le jour même du prélèvement, on verse le contenu du pot en plastique (b) dans le bol en verre d'un Waring blender et on rince avec 60ml H3PO4. On homogénéise 15s à petite vitesse et 2 fois 1 mn à grande vitesse.

On filtre sur filtre GF/A sur entonnoir de Buchner (15cm de diamètre) en rinçant avec 60 ml d'H3PO4 0,1M. On transvase en fiole de 250ml et on ajuste en rinçant avec de l'eau distillée. L'extrait est versé dans des tubes en verre à vis et est utilisé pour le dosage des composés cyanés et pour le dosage des AGV par CPG.

NB: Pour les produits cuits, la prise d'essai est de 60g: on ajuste après broyage à 250g avec H3PO4 0,1M, on centrifuge à 5000 tr/mn pendant 20mn et on filtre le surnageant sur GF/A: le volume final de récupération pris en compte est 250 - (Pe x ms).

4.3. Prise d'essai en vue d'analyses chimiques ultérieures.

Le sac (c) est mis au congélateur en attendant que la prise d'essai soit lyophilisée puis réduite en poudre à l'aide d'un broyeur de laboratoire.

4.4. Extraction en vue du dosage des AGV par HPLC.

Une partie du contenu des sacs (e) est utilisé le jour même pour la préparation des extraits servant au dosage des AGV par HPLC: 40g sont broyés à l'ultra-turrax dans 20ml H2SO4 0,006 M puis centrifugés à 5000tr/mn pendant 10 mn; les surnageants sont filtrés sur membrane millipore (0,45µm) et conservés au congélateur avant d'être envoyés à Montpellier pour analyses.

5. Détermination du pH et de l'acidité totale des échantillons.

A partir du contenu des sacs (D) comme pour les farines, l'extraction est réalisée en double (le jour même du prélèvement pour les échantillons frais).

Dans le pot en inox du Waring Blender, on place 20g de racines et on verse 120ml d'eau fraîchement distillée. On homogénéise 15s à petite vitesse et 1mn à grande vitesse. On filtre sur filtre GF/A sur entonnoir de Buchner (9cm de diamètre) en rinçant avec 30 ml d'eau. On transvase en bécher et on ajuste à 200ml sur la balance avec de l'eau distillée.

2 fois 40 ml sont utilisés pour la détermination en double de l'acidité par titrage par de la soude 0,01N.

Le reste sert à la détermination du pH au pHmètre.

NB: Pour les produits cuits, on ajuste après broyage à 208g avec de l'eau distillée, on centrifuge à 5000 tr/mn pendant 20mn et on filtre le surnageant sur GF/A: le volume final de récupération pris en compte est 208 - (Pe x ms).

6. Analyses chimiques.

6.1. Dosage des composés cyanés.

Les cyanures libres et les cyanures totaux sont dosés selon la méthode de COOKE (1979). L'ensemble cyanhydrines + cyanures libres est dosé selon le même schéma que les cyanures totaux sauf que le passage au bain-marie est supprimé et que la solution tamponnée de linamarase est remplacée par une solution du même tampon ne contenant pas d'enzyme.

6.2. Détermination des teneurs en acides gras volatils par CPG.

* Préparation des échantillons:

- 1,5 ml de filtrat préparé comme précédemment décrit sont transvasés en tubes eppendorf et centrifugés pendant 5 mn (Sigma 201M).
- Les étalons sont préparés à 1 et 2,5 g/l et acidifiés avec H3PO4 50% (V/V)

* Conditions opératoires

	1ère série d'essais	2ème série d'essais
	-----	-----
- Type de chromatographe	Girdel 3000	
- colonne	Supelco (Nuko réf 2-5326, DI=0,53 mm; l=15m)	Sep
- Température: . Four	150°C	180°C
. Injecteur	200°C	250°C
. Détecteur	200°C	250°C
- Débits gazeux. gaz vecteur	Hélium: 3,6ml/mn	Azote: 25 ml/mn
. Hydrogène:	27 ml/mn	30 ml/mn
.	Oxygène: 667 ml/mn	Air: 300 ml/mn

6.3. Détermination des teneurs en acide lactique.

Les teneurs en acide lactique ont été déterminées, d'une part, par HPLC en même temps que les AGV (forme d et l) et, d'autre part en utilisant un biocapteur commercialisé par BIOBLOCK SCIENTIFIC sous le nom de Bioanalyzer System 2 (forme l uniquement).

7. Analyses microbiologiques.

L'objectif était le dénombrement des bactéries totales, des bactéries lactiques et des populations ayant des activités amylolytiques, pectinolytiques, cellulolytiques et β -galactosidasiques.

La suspension de départ était constituée de 60 grammes de matière humide broyée dans 540 ml d'eau distillée stérile à l'aide d'un Waring Blender.

Chaque dilution a été réalisée en ajoutant à 9ml d'eau physiologique stérile, 1 ml de la dilution précédente.

La numération des différents groupes bactériens a été obtenue par ensemencement de milieux de culture spécifiques:

- Microflore totale:

- . Milieu solide: dépôt de 1ml de la dilution en boîte de pétri; coulage du milieu (Gelose standard PCB pH 7.0) en double couche; incubation des boîtes à 30°C pendant 48 à 72 heures avant dénombrement.

- . Milieu liquide: dépôt de 1ml de la dilution dans des tubes préalablement stérilisés (120°C pendant 20mn) et remplis de 9ml de milieu (5g d'extrait de levure, 5g de peptone, 10g de glucose pour 1000ml d'eau - pH 7,2); évaluation des bactéries par la méthode de Mac Crady (NPP: série de 3 tubes).
- Microflore lactique: dépôt de 1ml de la dilution dans une boîte de pétri; coulage du milieu (50µl de solution de bleu d'aniline stérile à 0,4 g/l pour 100 ml de gélose MRS fondu - pH 6,4) en double couche; incubation des boîtes à 30°C pendant 48 à 72 heures avant dénombrement.
- Bactéries pectinolytiques: coulage du milieu en boîtes de pétri (4,5ml de NaOH 1N, 3ml de CaCl₂ à 10%, 1g de NaNO₃, 50mg d'extrait de levure, 1,5g de Bacto agar, 15g de polypectate de sodium dans 500ml d'eau distillée additionnée de 1ml de solution de violet cristal à 0,075% avant stérilisation 20mn à 120°C); ensemencement par 0,05 ml de solution mère; dénombrement des dépressions créées par les colonies pectinolytiques.
- Bactéries amylolytiques: dépôt de 1ml de la dilution dans des tubes préalablement stérilisés (120°C pendant 20mn) et remplis de 9ml de milieu (5g d'extrait de levure, 5g de peptone, 20g d'amidon soluble pour 1000ml d'eau - pH 7,2); Test de la dégradation de l'amidon par addition dans chaque tube de quelques gouttes d'une solution de lugol à 10%; évaluation des bactéries par la méthode de Mac Crady (NPP: série de 3 tubes).
- Bactéries cellulolytiques: coulage du milieu en boîtes de pétri (1g de K₂HPO₄, 1g de KNO₃, 0,5g de MgSO₄, 0,2g de CaCl₂, 2 gouttes de perchlorure de fer, 5g de Biotrypcase, 20g de gélose et 7,5g de cellulose MN300 dans 1000ml d'eau - pH 7,1 à 7,5); stérilisation 20mn à 110°C); ensemencement par 0,05 ml de solution mère; dénombrement des halos verts (plage de lyse) entourant les colonies cellulolytiques.
- Bactéries à activité β-galactosidasique: coulage du milieu en boîtes de pétri (10g de lactose; 2g d'extrait de levure; 2g de Biotrypcase, 15g de gélose dans 1000ml d'eau - pH 7,2); stérilisation 20mn à 110°C; ensemencement par 0,05 ml de solution mère; incubation pendant 30mn en présence d'une solution d'ONPG 0,5% des colonies ayant poussé sur ce milieu (coloration en jaune des tubes positifs).

8. Bilans massiques et mesure des temps de travaux.

Les bilans massiques en matière brute et en matière sèche comestible au cours de l'épluchage et du rouissage et pendant la transformation des racines en fougou et chikwangue sont effectués par pesée et détermination de la teneur en matière sèche aux différentes étapes des transformations (cf annexe 2A et 2B: exemples de feuilles d'enregistrement des données pour la transformation de racines épluchées avant rouissage en farine et pour la transformation de racines épluchées après rouissage en chikwangue).

La détermination des temps de travaux, en particulier pour l'épluchage, s'effectue dans des conditions standardisées (personnel, outil, grosseur des tas...).

9. Comparaison des caractéristiques organoleptiques des produits finis.

L'influence des différentes modalités de rouissage sur les caractéristiques organoleptiques du fougou et de la chikwangue est étudiée au cours d'essais comparatifs en unité d'évaluation sensorielle (bâtiment

spécialement aménagé par Agricongo) en utilisant 10 à 12 panélistes préalablement sélectionnés à l'aide des tests décrits dans la norme AFNOR NF V 09-002.

Pour chaque essai, tous les produits correspondant à une des variantes de l'essai sont comparés deux à deux: après un premier test de différenciation (test 2/5), les couples de produits sont soumis aux panélistes les ayant différenciés pour un test de caractérisation, puis pour un test de préférence.

Les caractéristiques comparées au cours des tests de préférence sont la couleur, l'odeur, l'acidité, la consistance dans la main, la consistance dans la bouche et l'impression générale; les tests de caractérisation consistent à demander pour chaque couple de produits celui qui est, le plus clair, le plus élastique, le plus collant, le plus acide et celui qui a l'odeur la plus forte

Au cours d'une autre séance, les produits de chaque essai sont soumis individuellement à un test de notation (échelle hédonique de 1 à 7) et, éventuellement, tous ensemble à un test de classement.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. ESSAIS METHODOLOGIQUES

1.1. Essai "intra-fût"

L'essai "intra-fût" a consisté à effectuer des mesures et analyses sur 3 (2 dans le cas des analyses microbiologiques) lots de 6 racines ayant roui dans un même fût pour juger de la répétabilité des résultats obtenus en prenant comme échantillons des lots de 6 racines.

Les résultats obtenus montrent la bonne répétabilité des mesures pour le pH (fig 1) et la teneur en acides totaux (fig 2) des racines; concernant les teneurs en cyanures totaux et cyanures libres (fig 3 et 4), les mesures sont relativement répétables sauf pour les cyanures totaux après un jour de rouissage, période à laquelle la vitesse de décomposition des glucosides cyanogénétiques est maximale.

Les valeurs obtenues pour les teneurs en éthanol (fig 5), en acide acétique (fig 6), en acide propionique (Fig 7) et en acide butyrique (Fig 8) sont plus dispersées, toutefois les écarts observés restent faibles en regard des variations en fonction de la durée de rouissage.

La flore totale et la flore lactique (fig 9), ont été dénombrés (milieu solide; 3 boîtes/dilution) sur deux échantillons correspondant à deux lots différents de 6 racines: les différents comptages ont montré une faible variation inter-échantillon des numérations sauf pour la flore totale en début de rouissage.

Suivre l'évolution du rouissage d'un ensemble de racines en prélevant au cours de celui-ci des échantillons de 6 racines de calibre représentatif semble donc pouvoir permettre une bonne caractérisation des processus biochimiques et, sauf en début de rouissage, une dénombrement fiable des populations bactériennes.

1.2. Essai "inter-fûts"

L'essai "inter-fûts" a consisté en des mesures et analyses sur 4 lots de 6 racines ayant roui simultanément dans 4 fûts identiques placés côte à côte pour juger de la répétabilité des résultats obtenus au cours de rouissages effectués dans des conditions standardisées.

FIGURE 1

pH DES RACINES

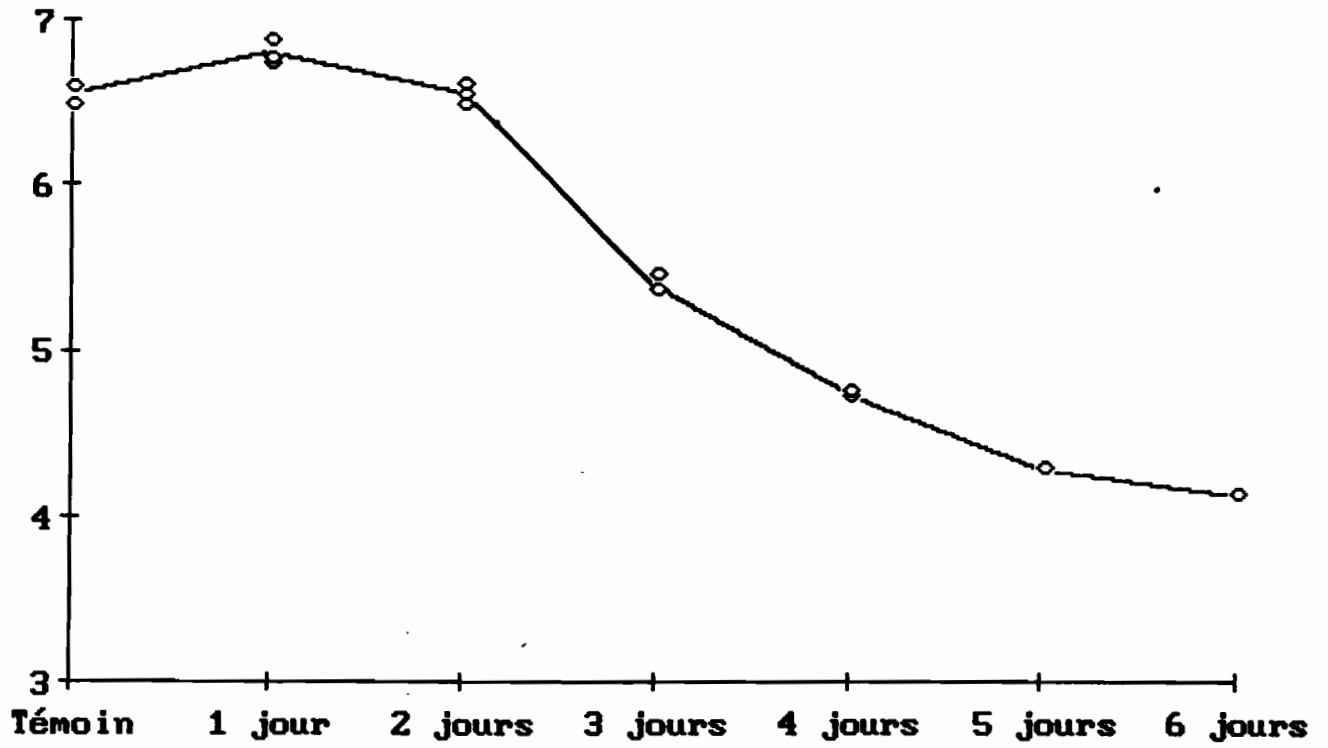


FIGURE 2

TENEUR EN ACIDES TOTAUX DES RACINES

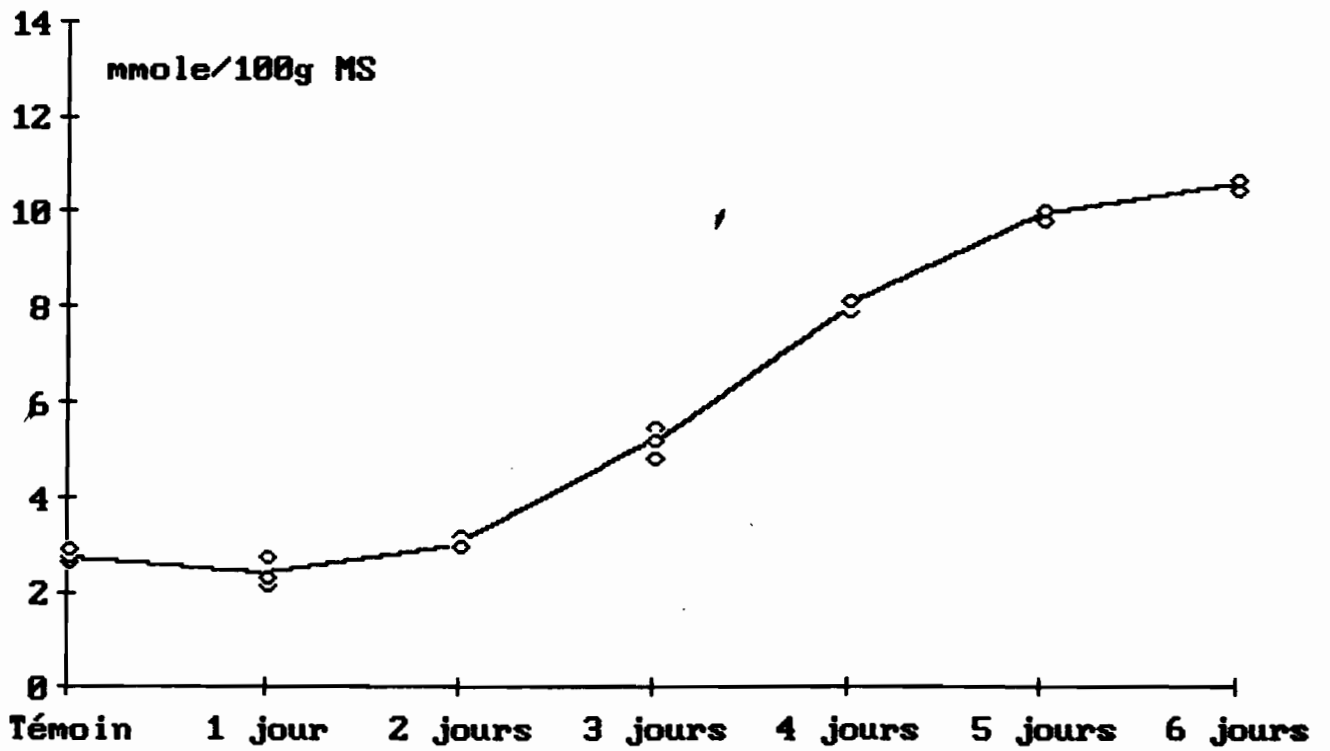


FIGURE 3

CYANURES TOTAUX

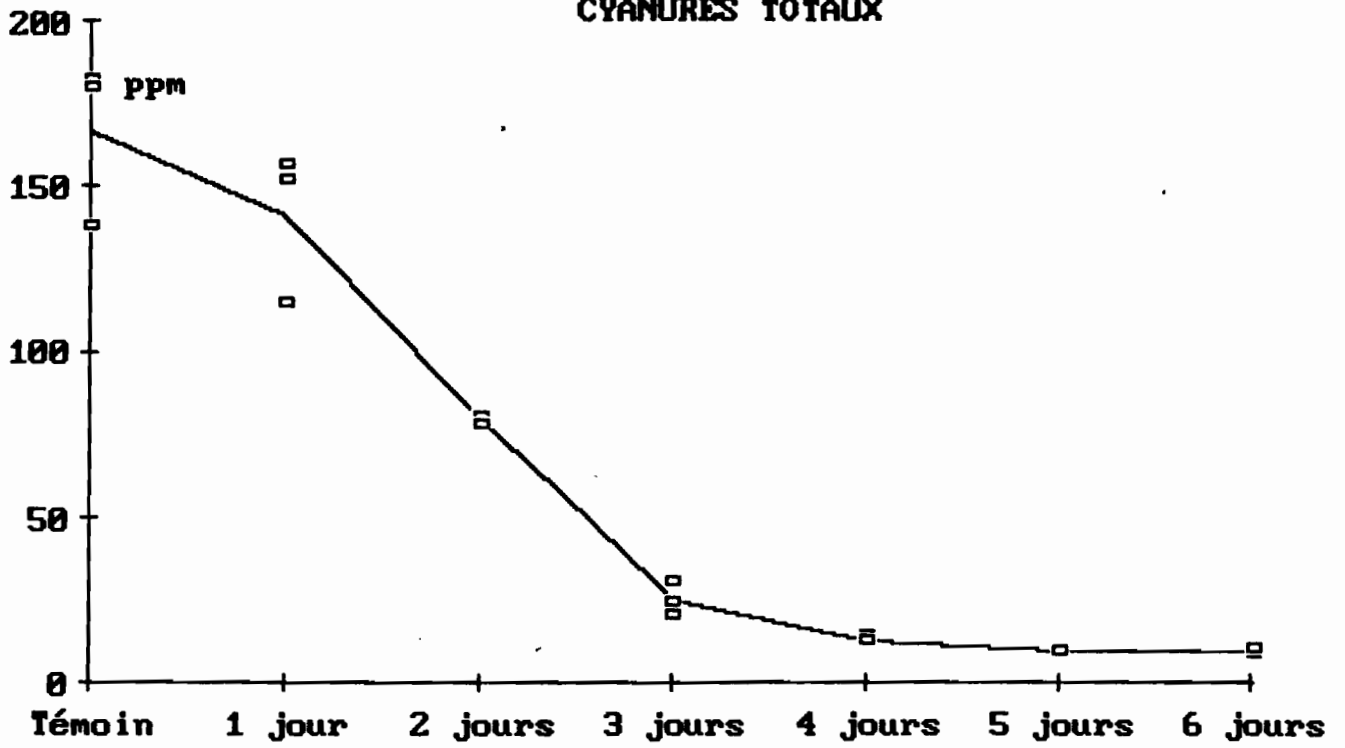


FIGURE 4

CYANURES LIBRES

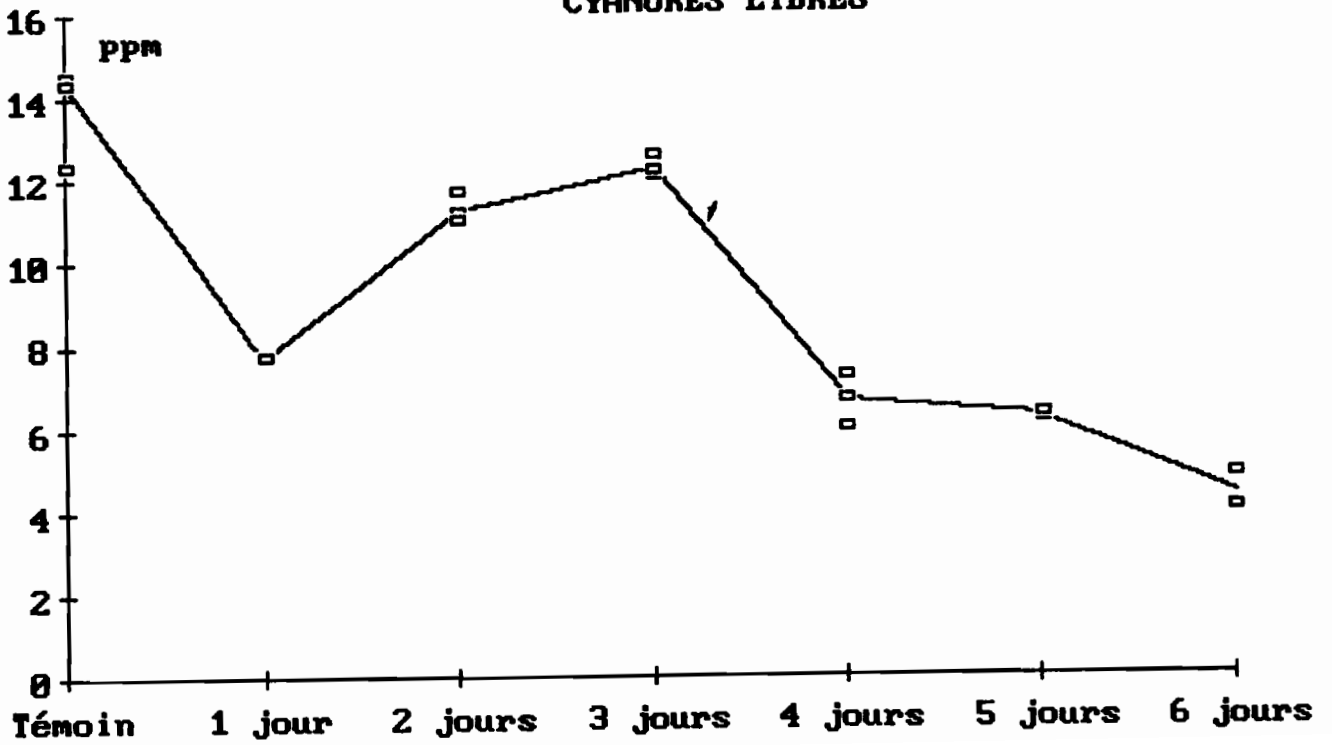


FIGURE 5

ETHANOL

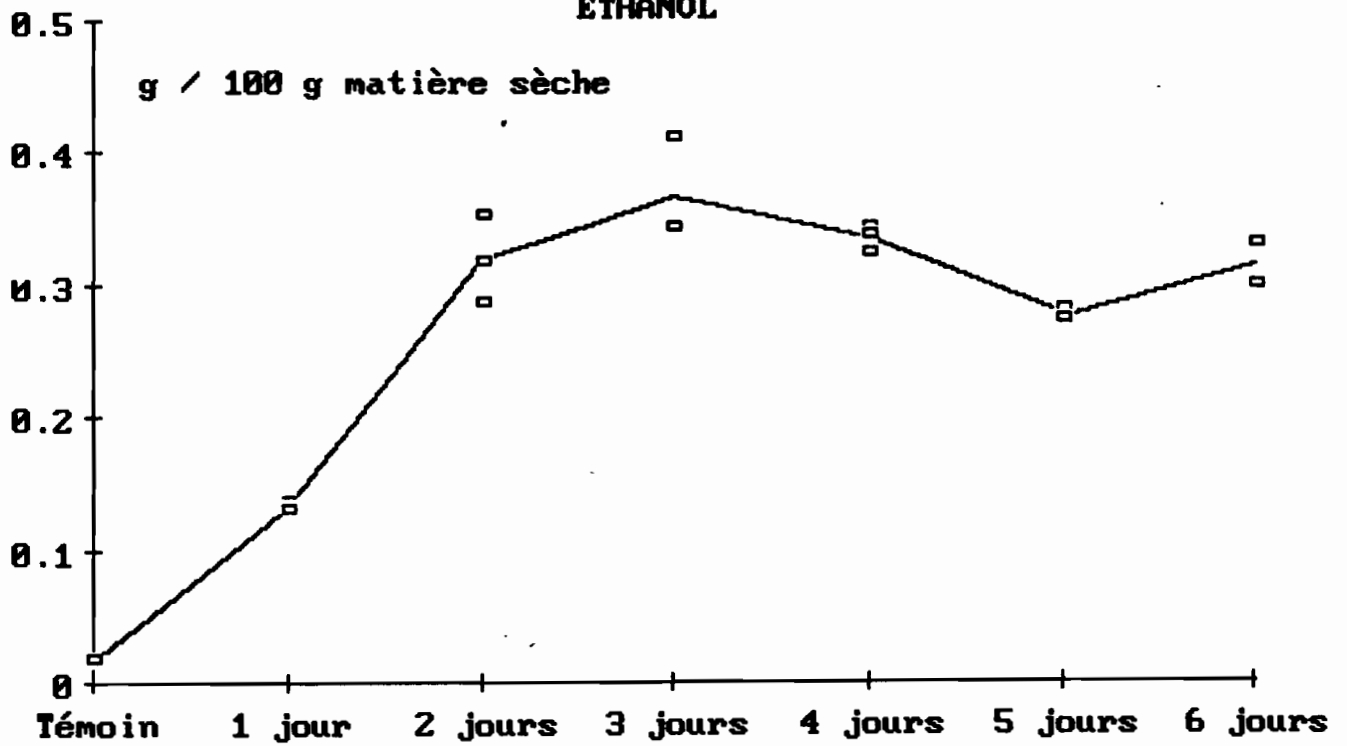


FIGURE 6

ACIDE ACETIQUE

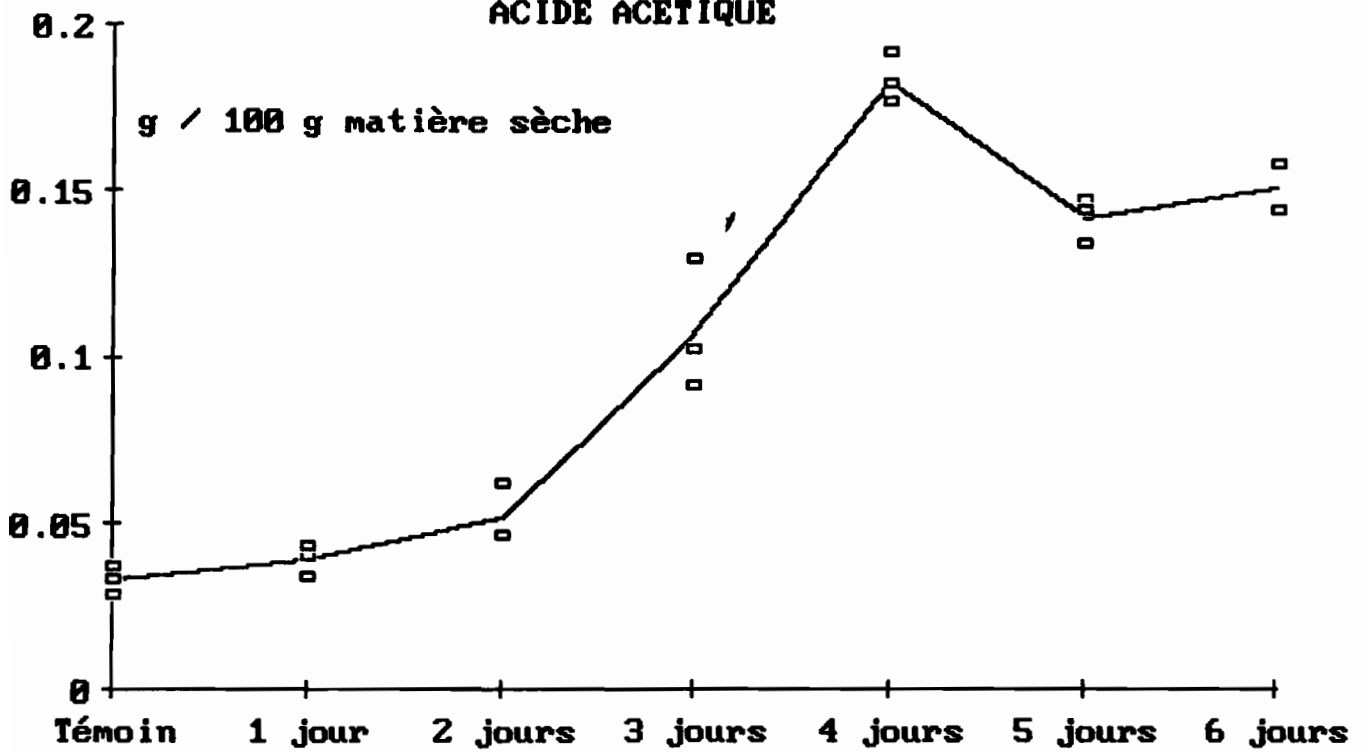


FIGURE 7

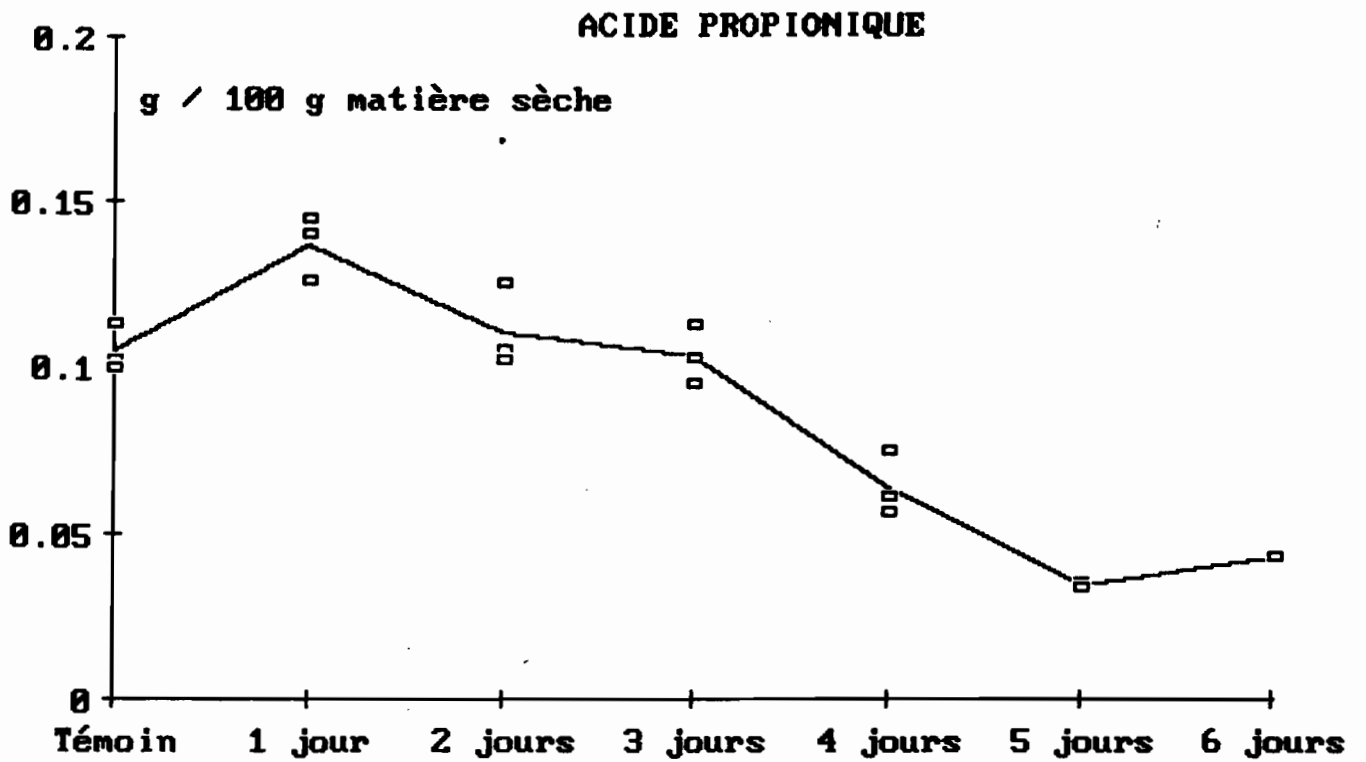


FIGURE 8

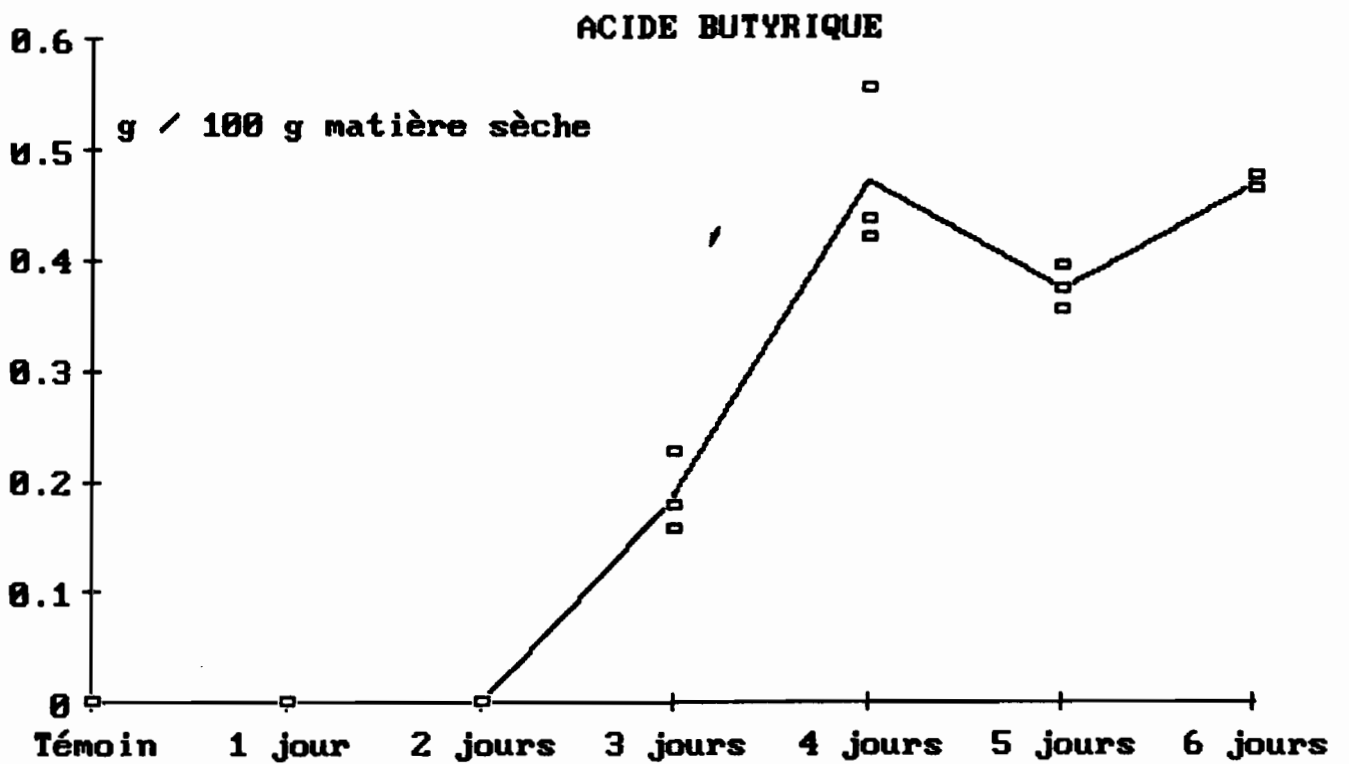
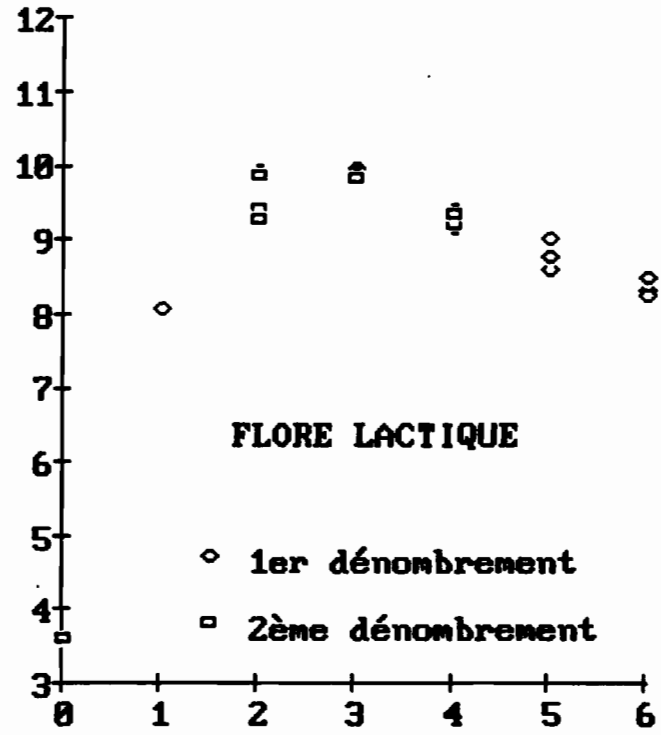
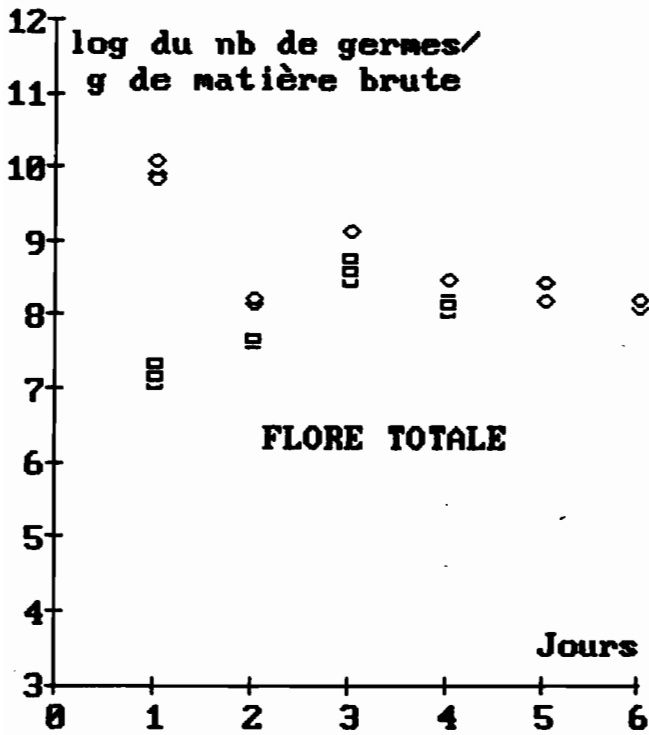
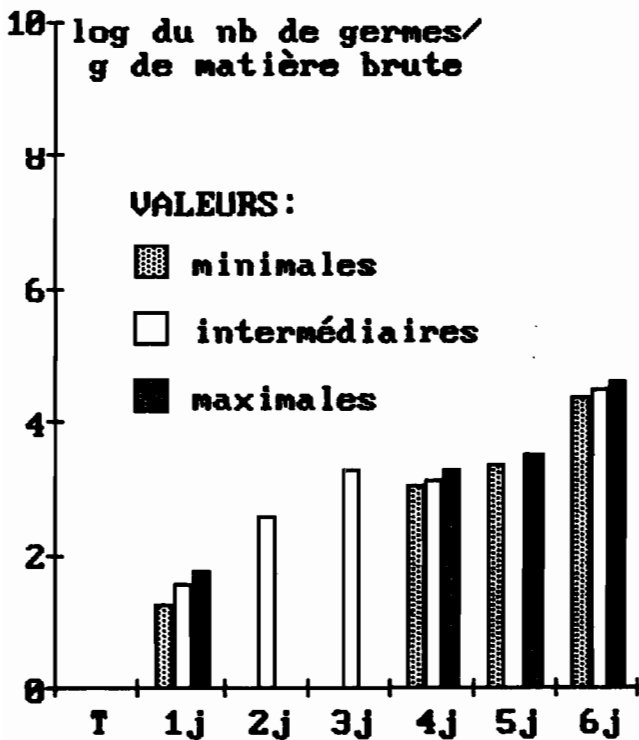


FIGURE 9

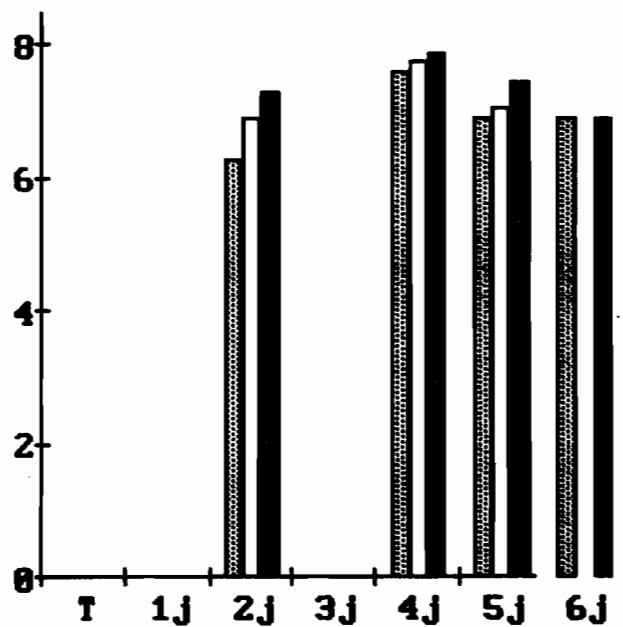
EVOLUTION DES POPULATIONS BACTERIENNES



LEVURES



BACTERIES AMYLOLYTIQUES



L'évolution des paramètres physico-chimiques (température, O₂ dissous, pH) a été quasiment identique dans les 4 fûts (fig 10 à 12); par contre, les écarts entre les pertes de poids des racines observées après 5 jours (fig 13) laissent supposer que le rouissage a été plus rapide dans le fût 1 et moins rapide dans le fût 2 que dans les autres fûts.

Si l'on observe une bonne répétabilité des mesures pour le pH des racines (fig 14), les écarts entre les valeurs obtenues pour les teneurs en acides totaux (fig 15) sont plus importants: les faibles valeurs obtenues pour les teneurs en acides totaux dans les échantillons prélevés dans le fût 2 après 2 et 5 jours confortent l'hypothèse d'un processus moins rapide dans ce fût.

Quelle que soit la durée de rouissage considérée, les teneurs en matière sèche des échantillons prélevés simultanément diffèrent de manière plus importante encore (fig 16).

Pour la détermination des composés cyanés (fig 17 à 20), deux extractions ont été réalisées à partir de chacun des échantillons prélevés dans les 4 fûts: on constate que la variabilité liée aux conditions d'extraction, malgré le soin mis à sa standardisation, est souvent plus importante que la variabilité inter-échantillons; néanmoins, ces deux sources de variabilité n'empêchent pas de mettre en évidence la dégradation de la linamarine (fig 18) et les évolutions des teneurs en cyanhydrines (fig 19) et en cyanures libres (fig 20) en fonction de la durée de rouissage.

Les teneurs en acide lactique (fig 21), en acide acétique (fig 22) et en éthanol (fig 24) présentent des variations "inter-fûts" dont l'importance relative dépend de la durée de rouissage (moins de 15% pour l'acide lactique après deux jours de rouissage; plus de 100% pour l'acide lactique après 5 jours); les différences de teneurs en acide propionique (fig 23) sont tellement importantes qu'elles empêchent de mettre en évidence d'éventuelles variations liées à la durée de rouissage.

Les numérations correspondant à une même durée de rouissage pour la flore totale (fig 25 et 26), la flore lactique (fig 27) et les bactéries amylolytiques (fig 28) ne diffèrent pas de façon importante (sauf pour les bactéries amylolytiques après 2 jours). On peut signaler l'influence notable de la nature du milieu utilisé sur les résultats des numérations de la flore totale (fig 25 et 26).

1.3. Discussion.

Il est important de répertorier les sources de variabilité pouvant affecter les mesures visant à caractériser un rouissage. Même pour un rouissage bien référencé en ce qui concerne l'installation utilisée (eau, récipient, température ambiante) et les racines mises à rouir (variété, âge à la récolte, durée de stockage, calibrage), on peut distinguer:

- une variabilité inter-rouissages qui regroupe la variabilité liée à l'installation et celle liée aux racines; elle est plus ou moins importante selon le niveau de standardisation atteint;
- la variabilité inter-échantillons ("intra-fût" des essais précédents) liée non seulement à la représentativité des racines tirées au sort mais également à d'autres facteurs comme leur place dans l'ensemble mis à rouir; le fait de constituer chaque échantillon à partir de 6 racines dont le calibre est représentatif de celui de l'ensemble mis à rouir permet de contourner certaines difficultés (réduction de la variabilité due à la taille des racines, possibilité d'obtenir suffisamment de matière pour l'ensemble des analyses...) mais il reste arbitraire.
- la variabilité liée au conditionnement de l'échantillon, en particulier celle liée à l'extraction pour les composés cyanés et les AGV ou celle liée à l'homogénéisation avant prélèvement pour ensemencement dans le cas des analyses microbiologiques;

FIGURE 10

TEMPERATURE DE L'EAU DANS LES FUTS EN PLASTIQUE

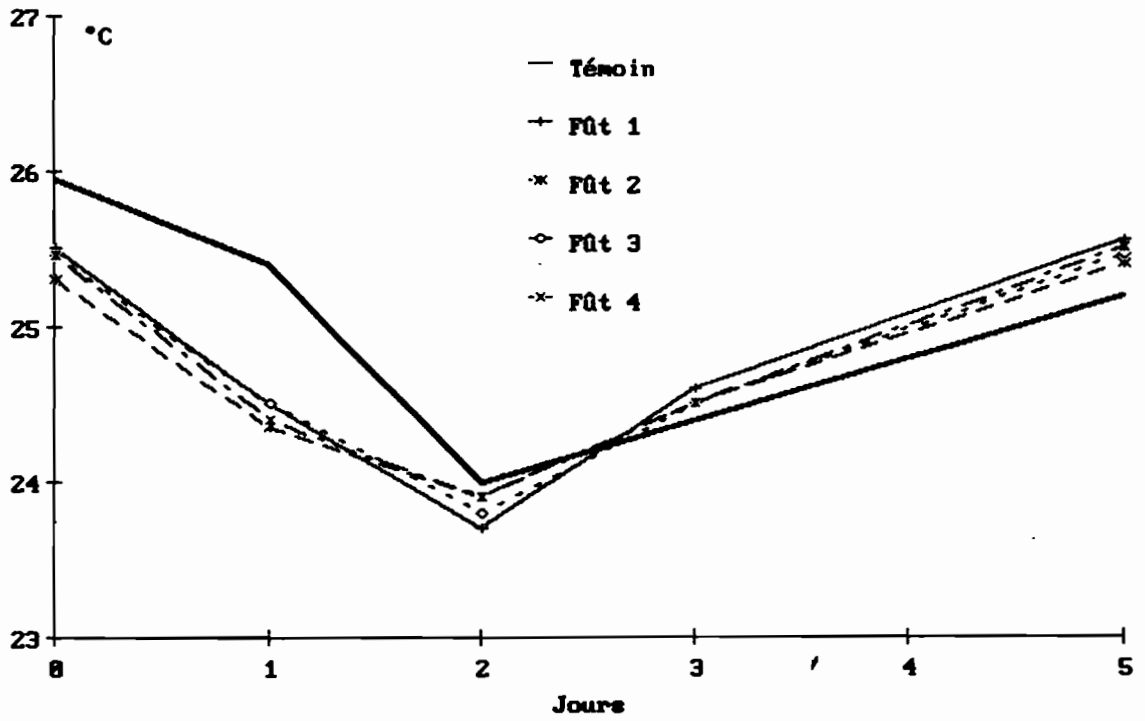


FIGURE 11

OXYGÈNE DISSOUS DANS L'EAU DES FUTS EN PLASTIQUE

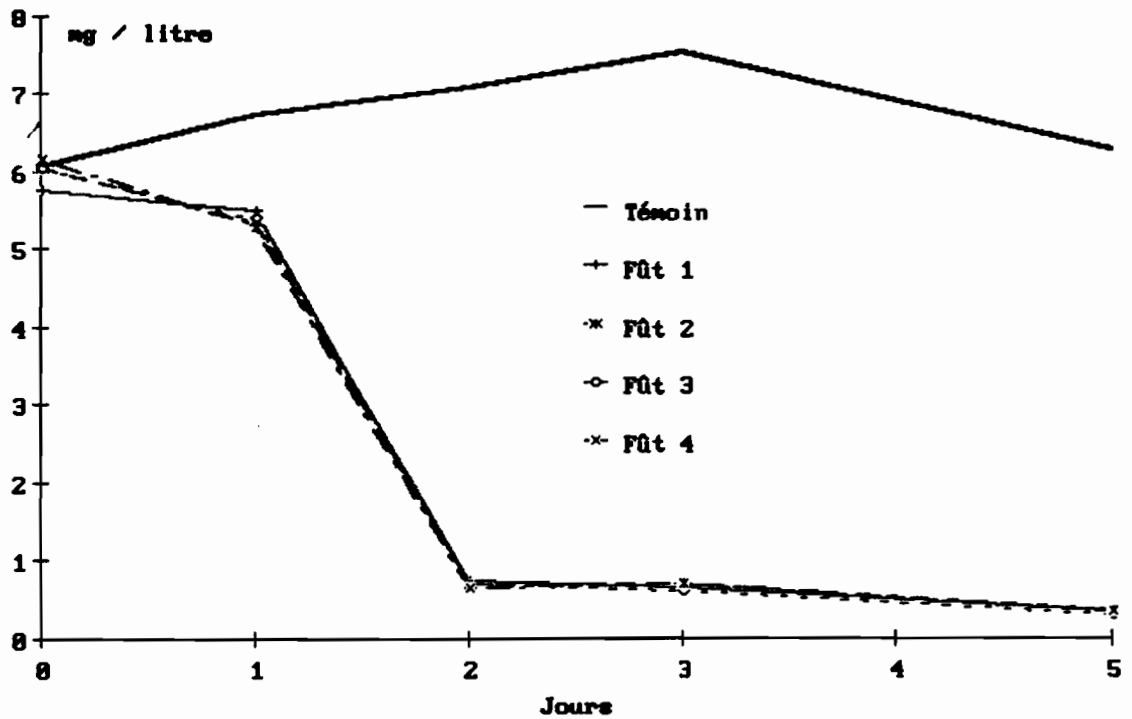


FIGURE 12

pH DANS L'EAU DES FUTS

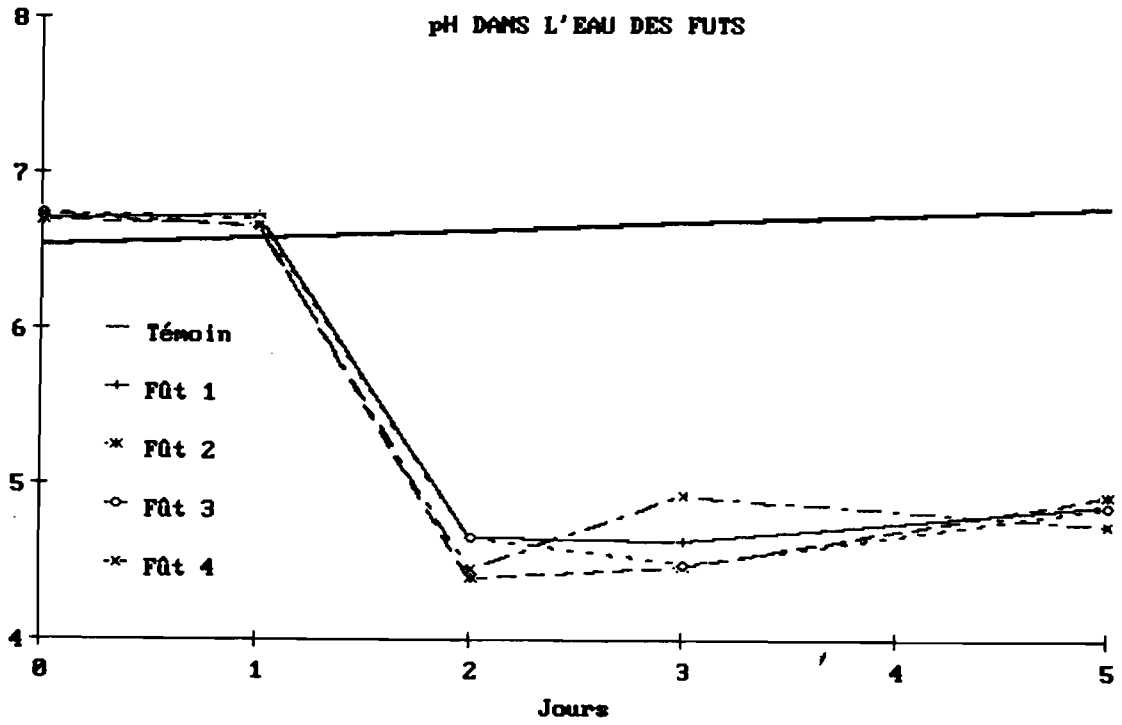


FIGURE 13

VARIATION DU POIDS DES RACINES APRES 2 ET 5 JOURS DE ROUISSAGE

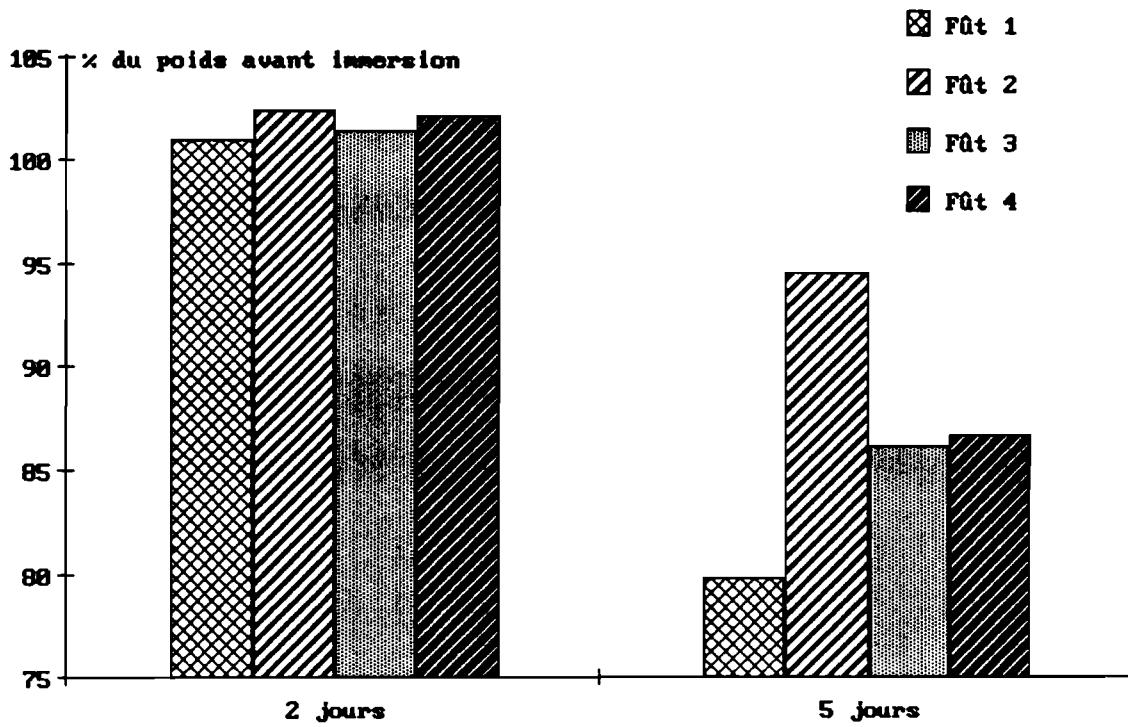


FIGURE 14
pH DES RACINES

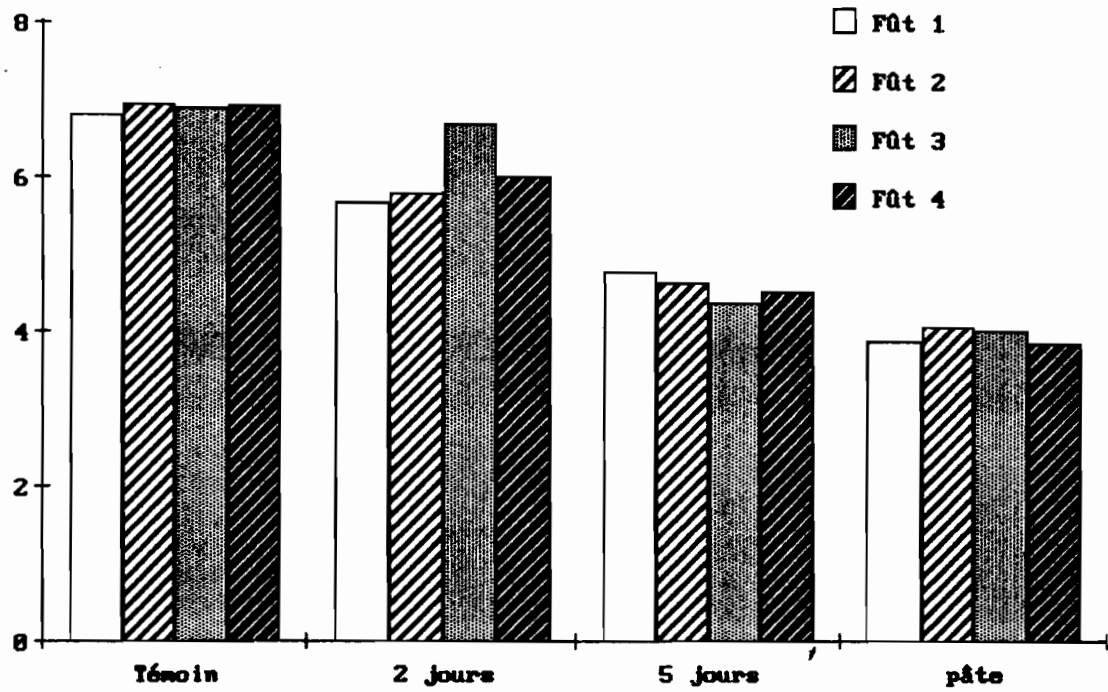


FIGURE 15
TENEUR EN ACIDES TOTALS DES RACINES

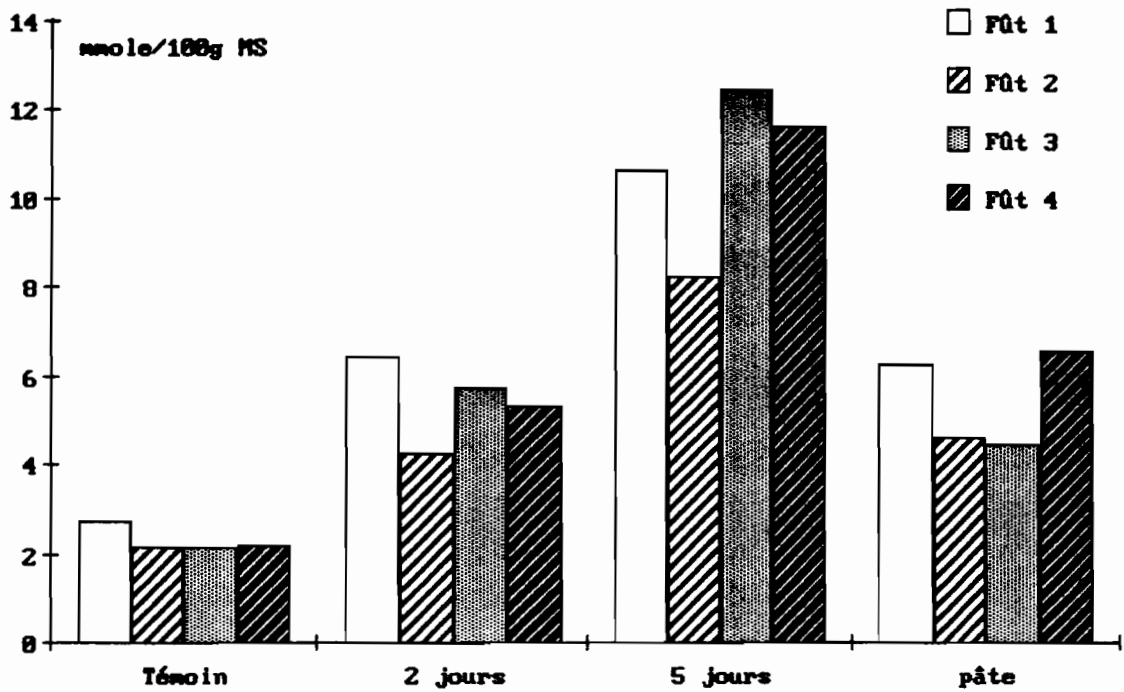


FIGURE 16

TENEUR EN MATIERE SECHE

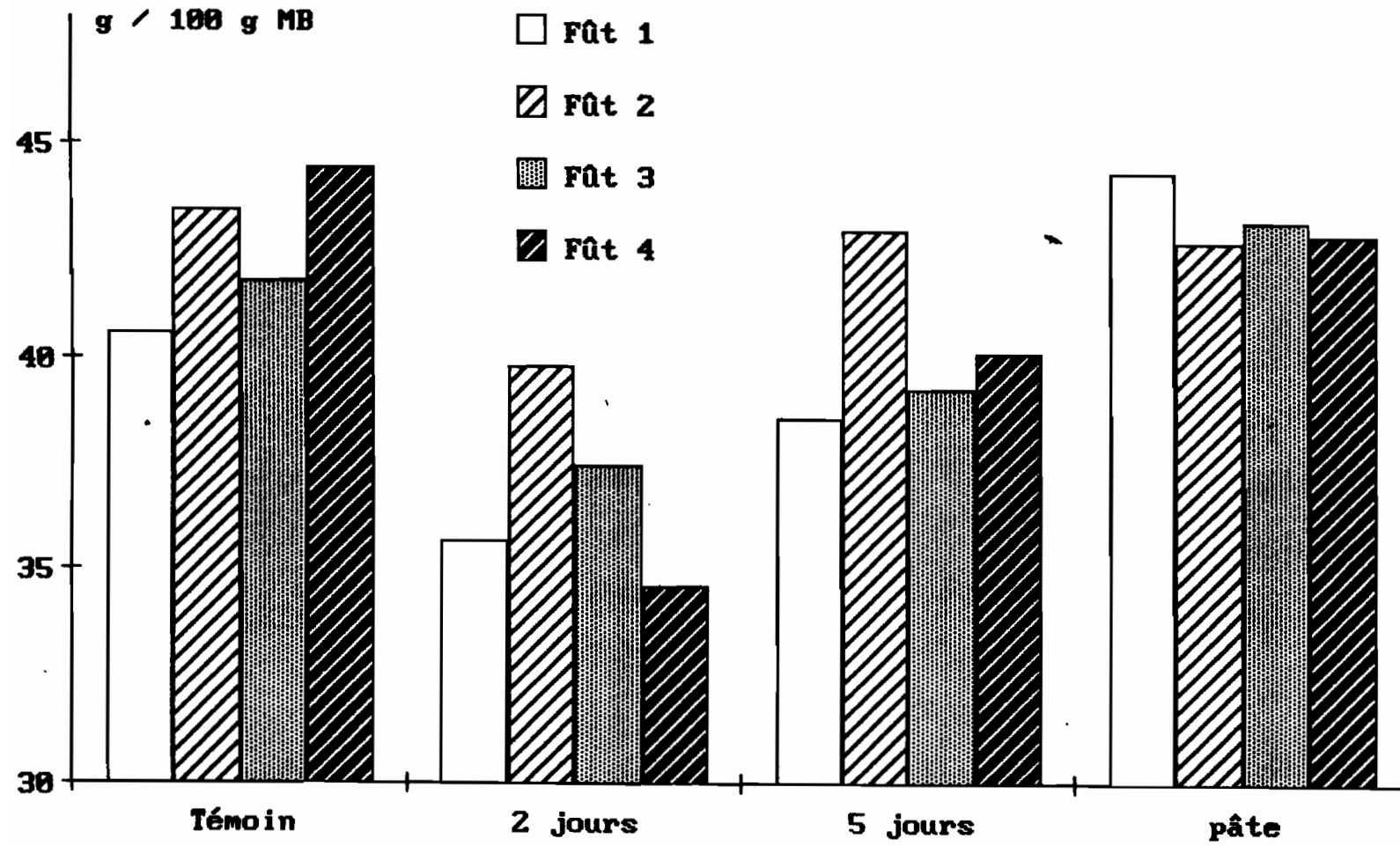


FIGURE 17
CYANURES TOTAUX

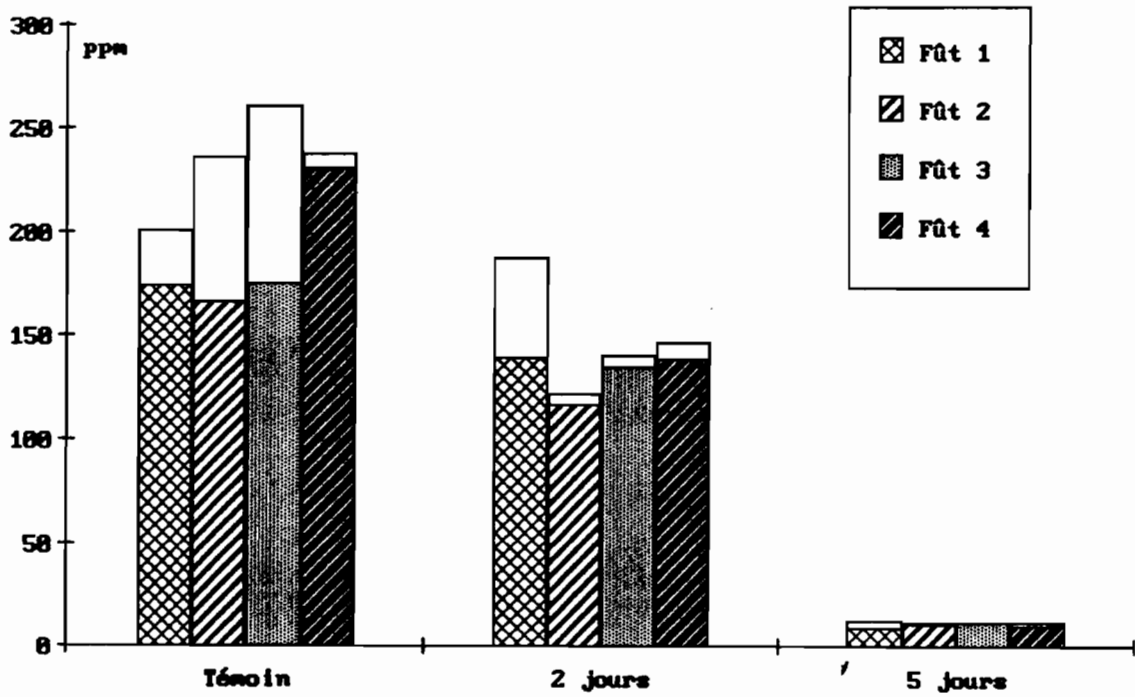


FIGURE 18
CYANURES LIBERES PAR LA LINAMARINE

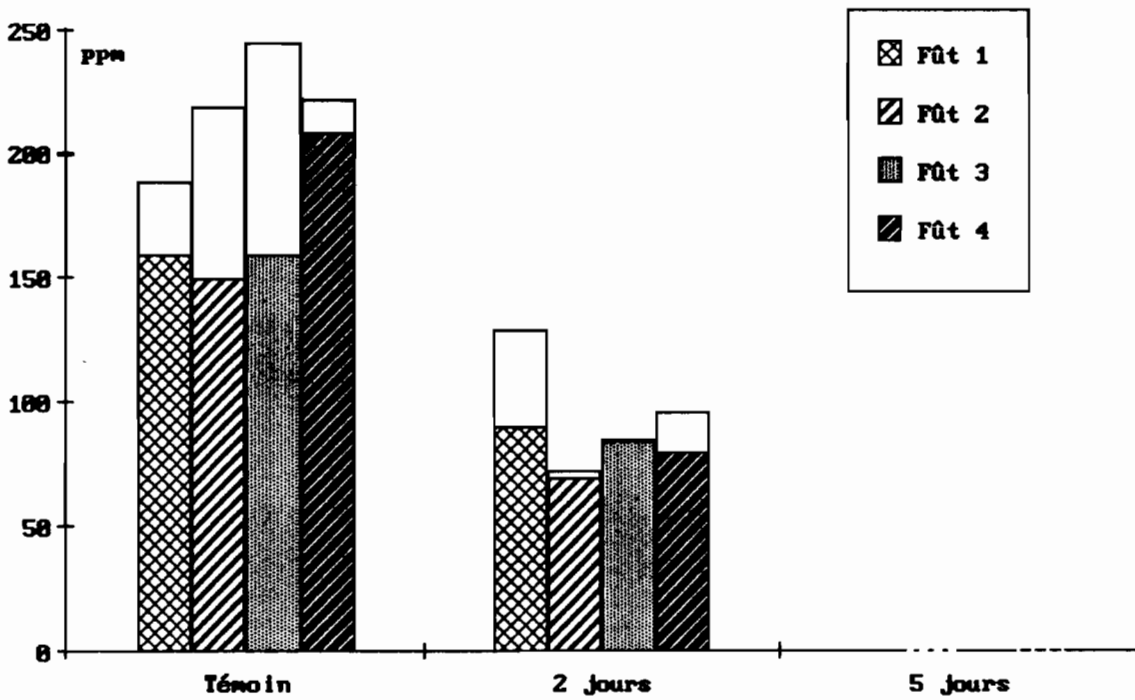


FIGURE 19
CYANHYDRINES

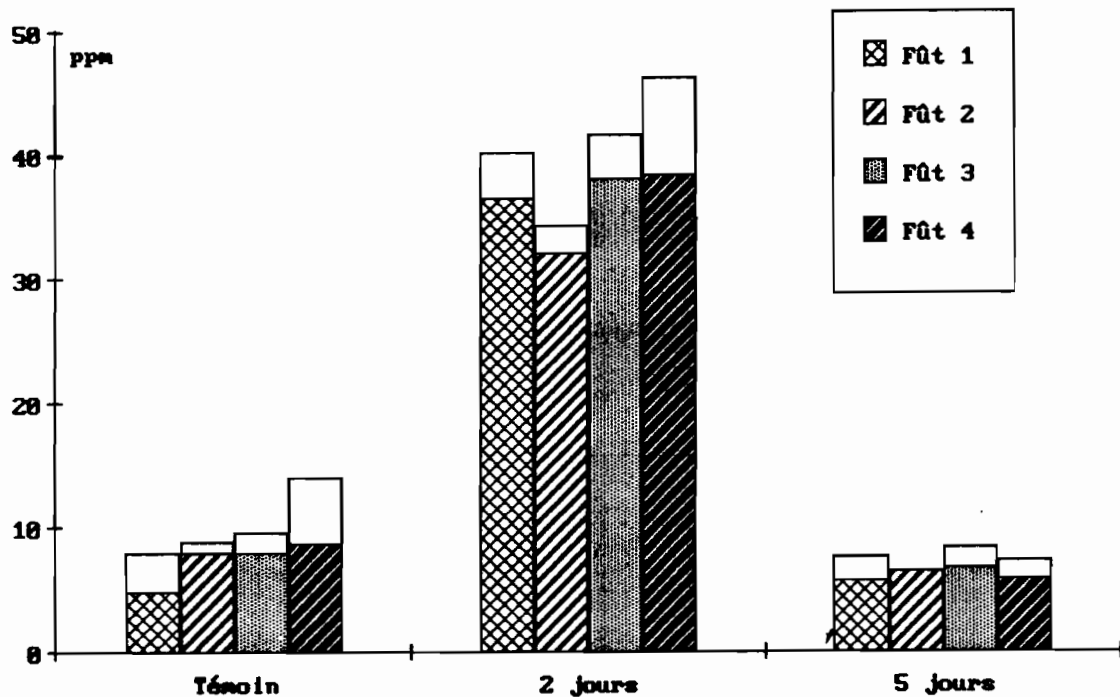


FIGURE 20
CYANURES LIBRES

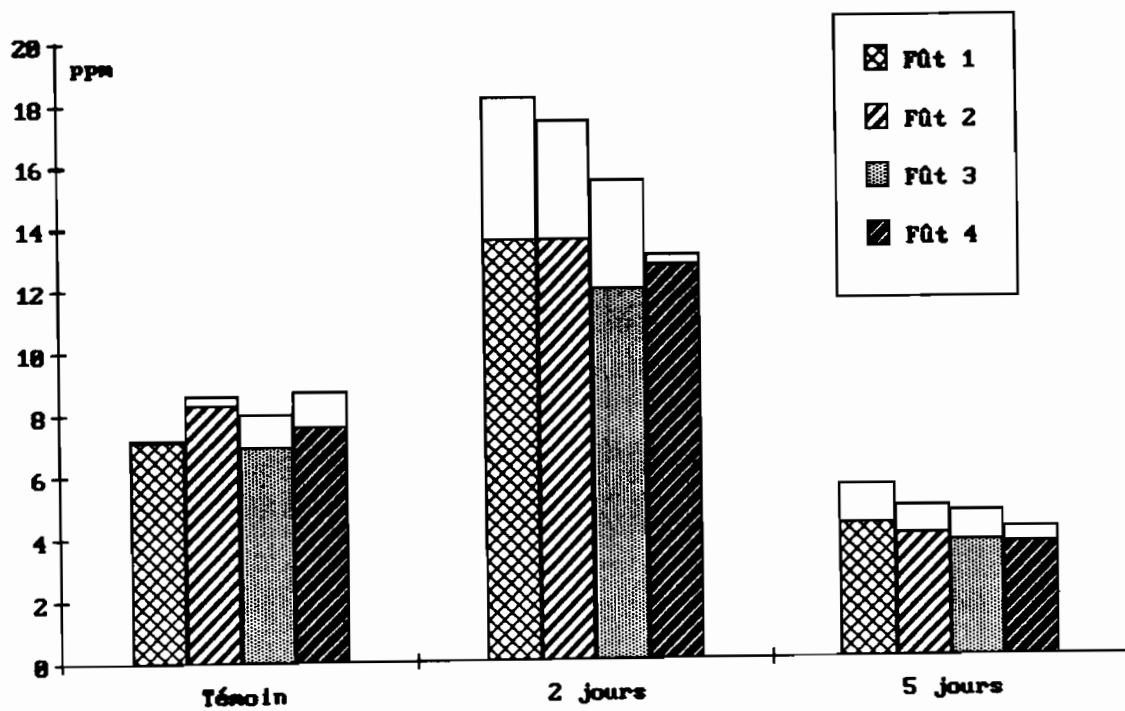


FIGURE 21

ACIDE LACTIQUE (HPLC)

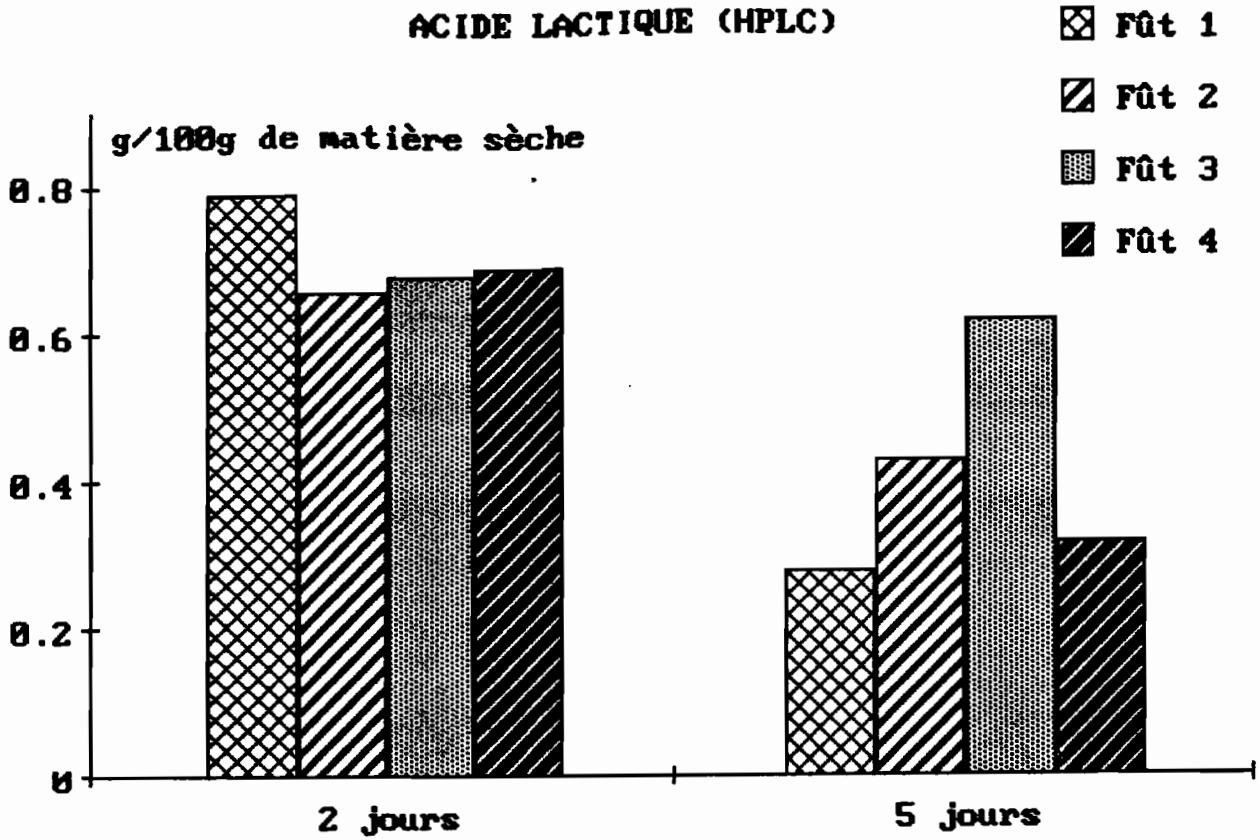


FIGURE 22

ACIDE ACETIQUE (CPG)

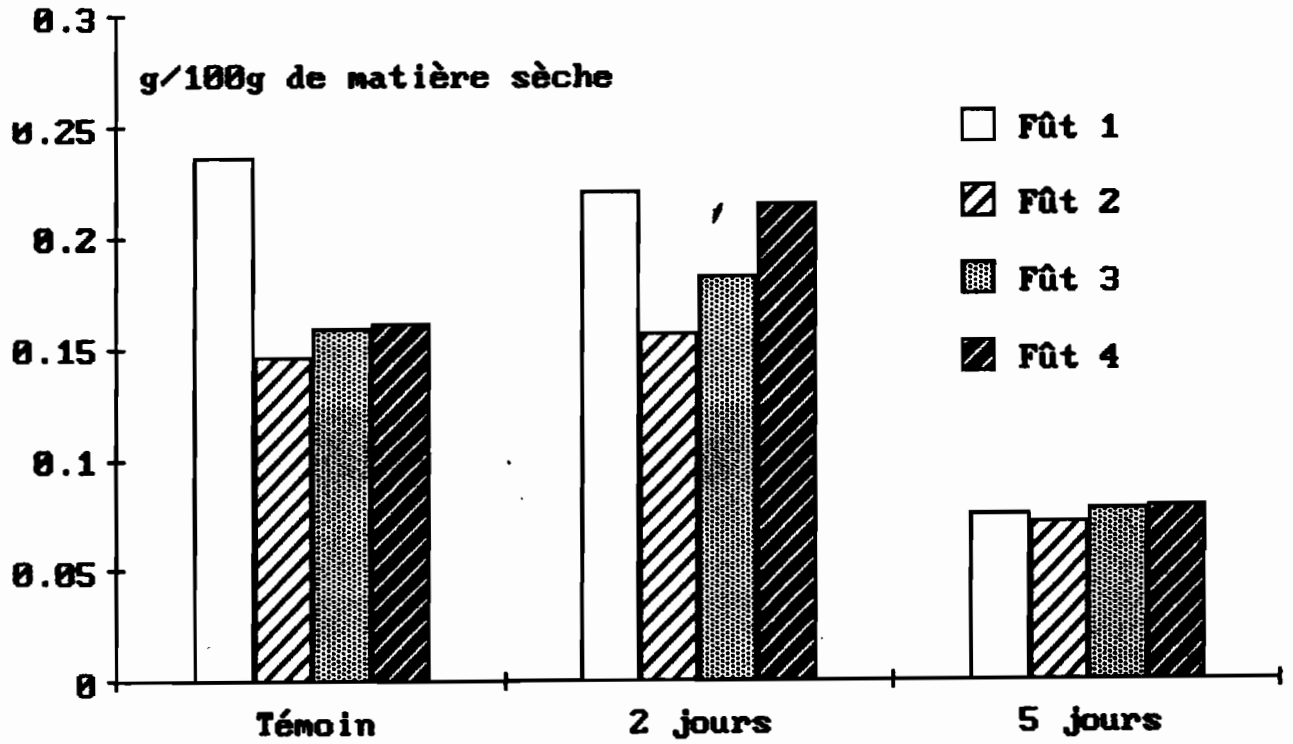


FIGURE 23

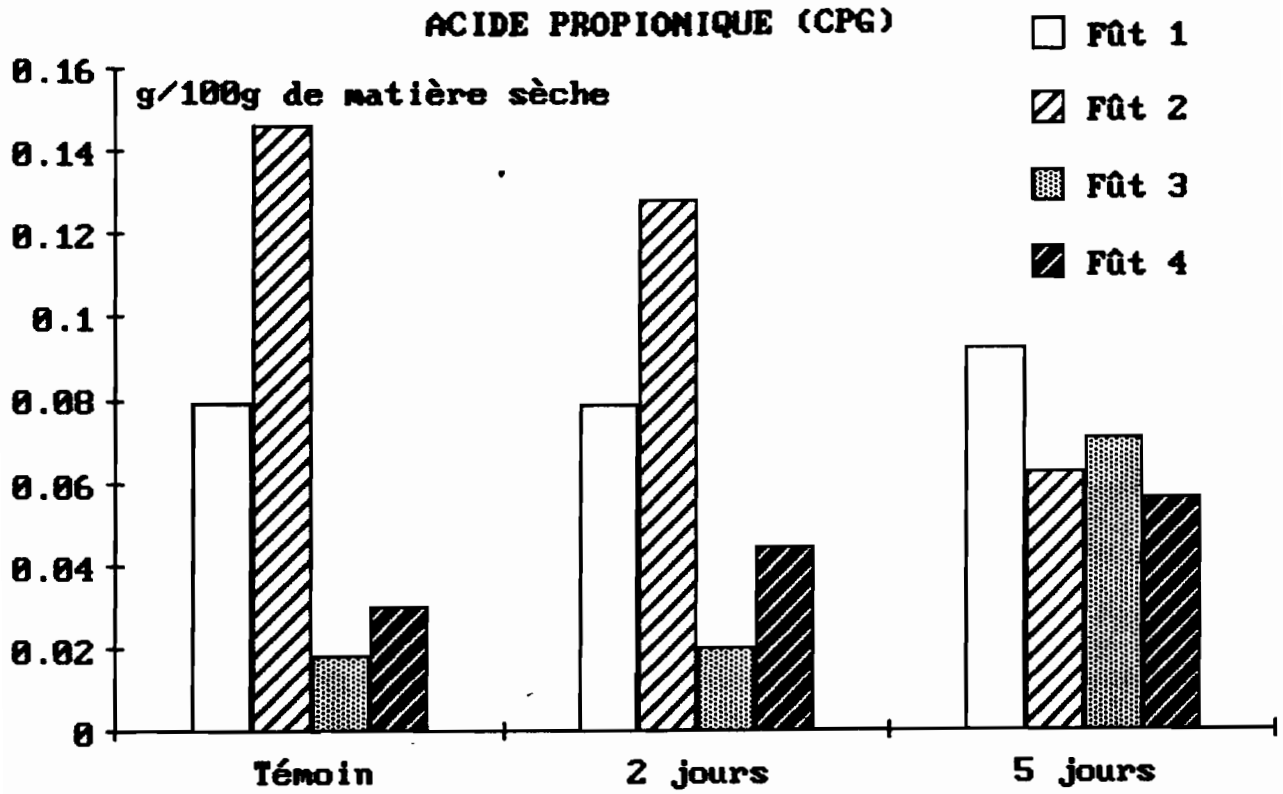


FIGURE 24

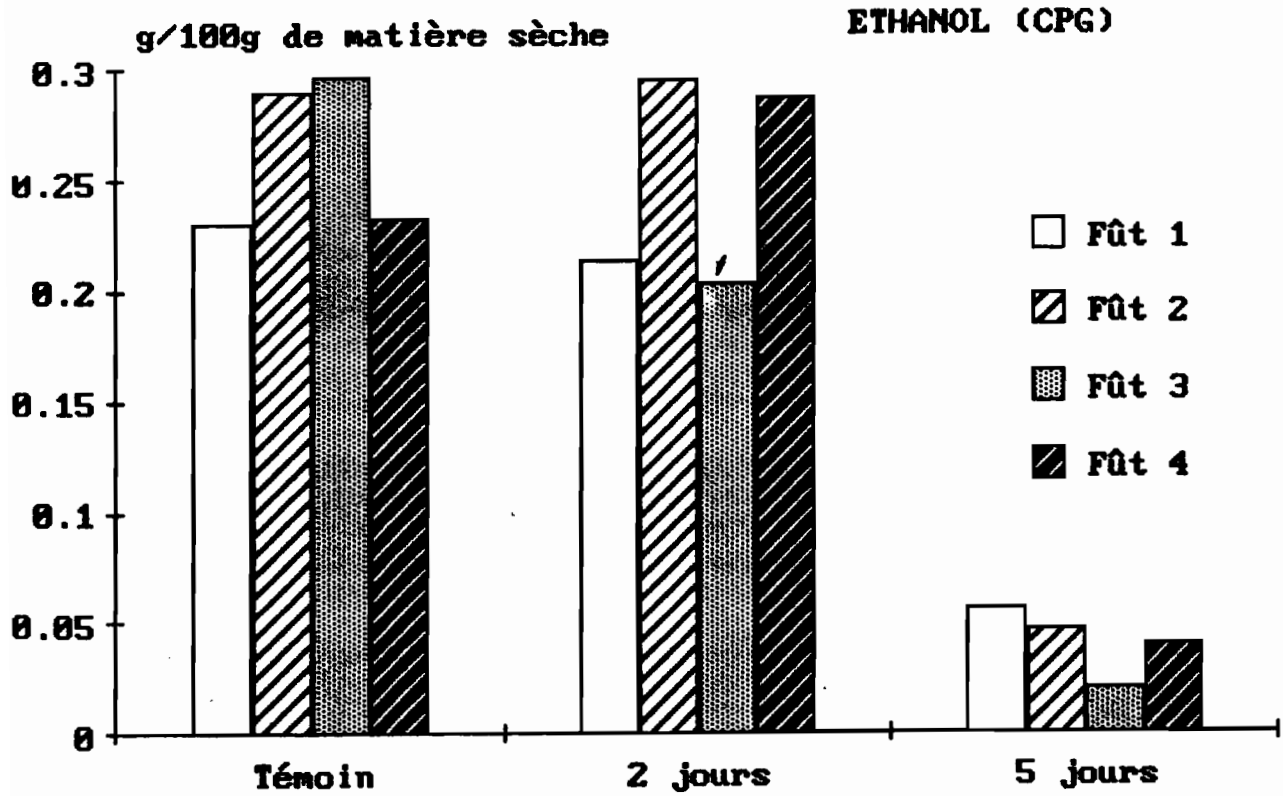


FIGURE 25

FLORE TOTALE AEROBIE

(milieu solide)

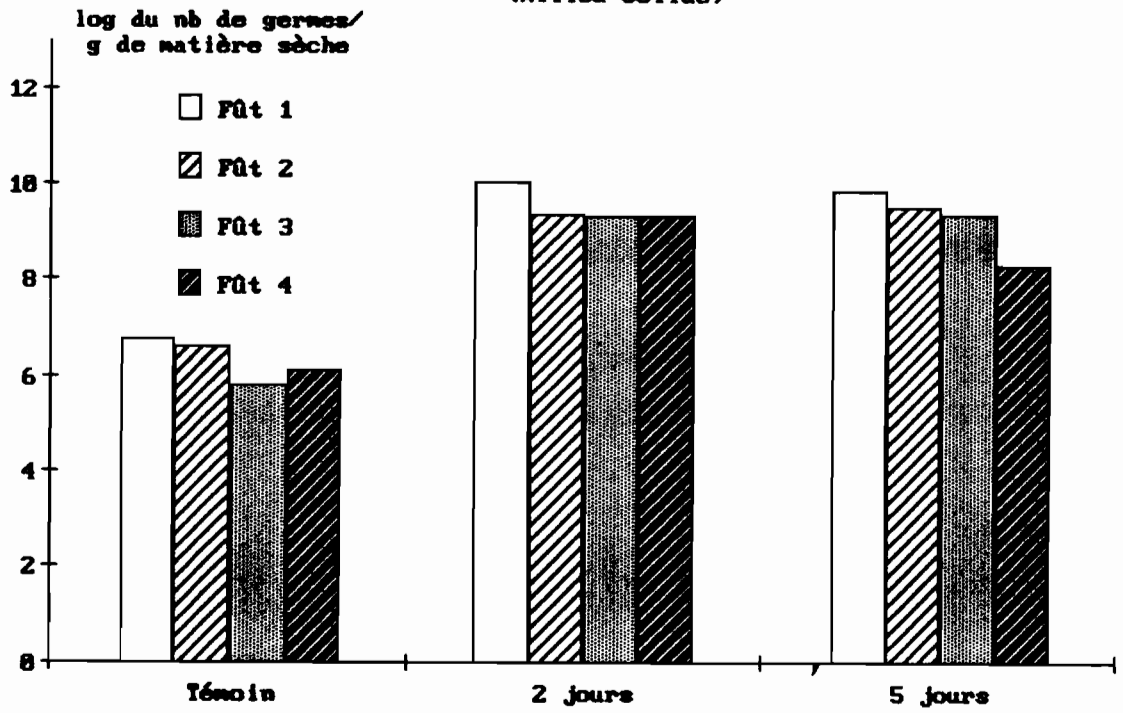


FIGURE 26

FLORE TOTALE AEROBIE

(milieu liquide)

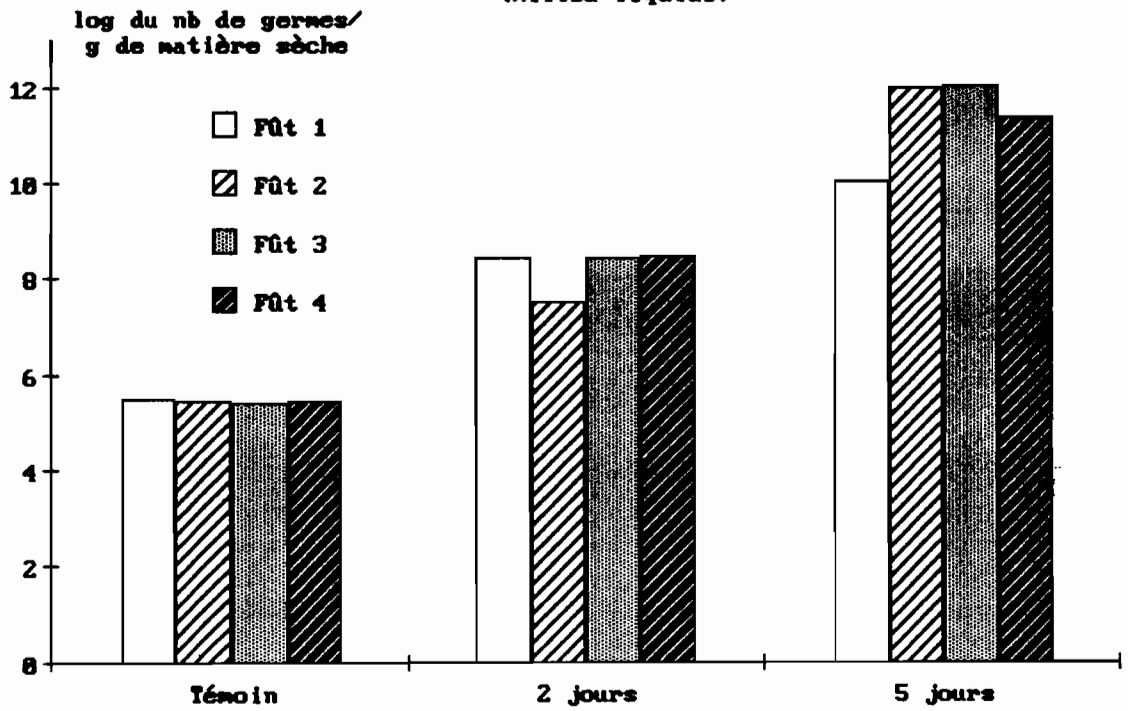


FIGURE 27

FLORE LACTIQUE

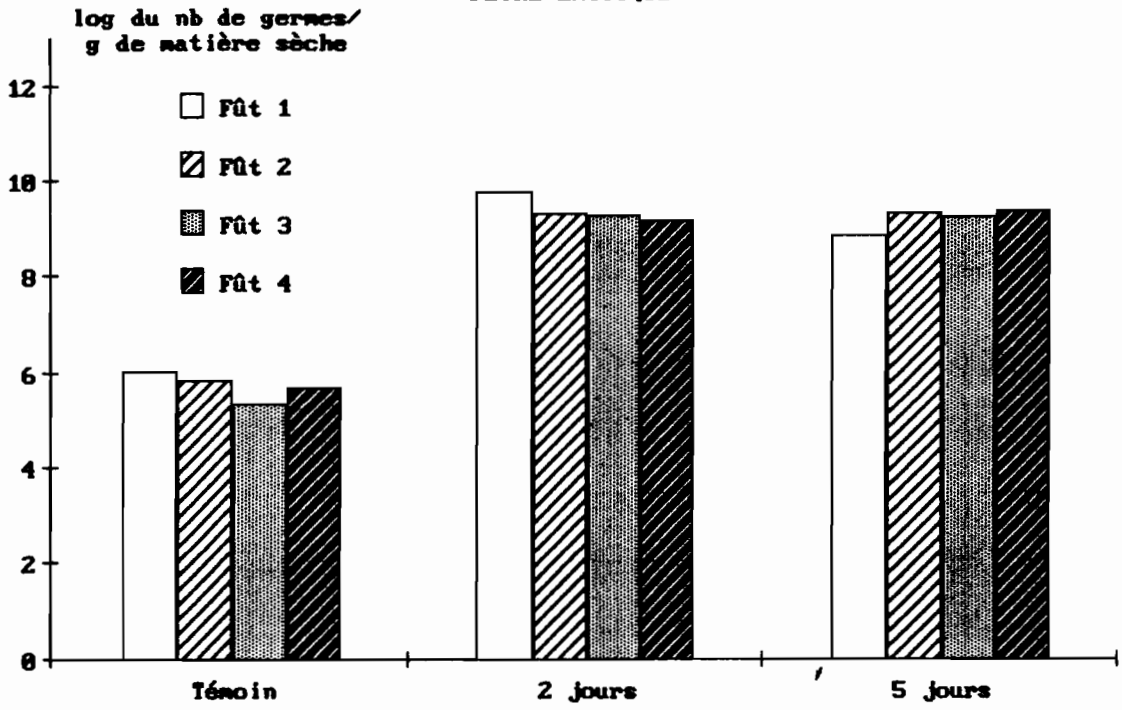
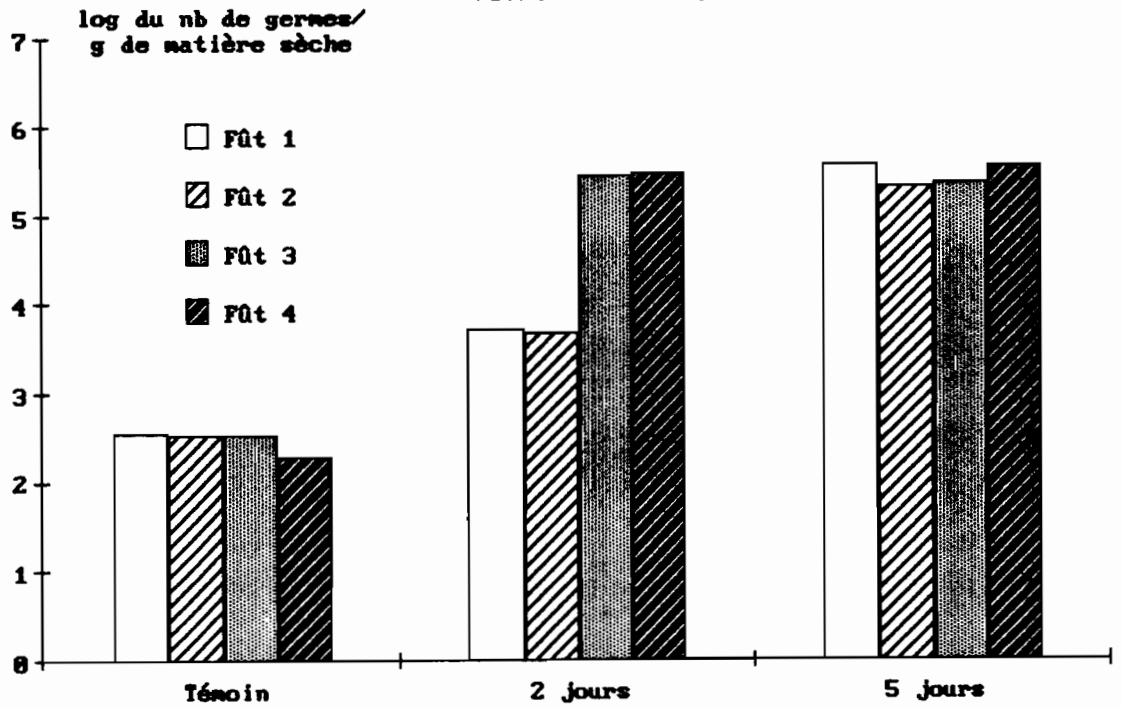


FIGURE 28

FLORE AMYLOLYTIQUE



- la variabilité due aux techniques utilisées pour les mesures et les dosages.

Les résultats obtenus au cours des essais précédemment décrits montrent que l'importance relative de ces différentes sources de variabilité varie en fonction du type de mesure effectué: les mesures physico-chimiques dans les fûts, les déterminations de pH dans les racines et les dénombrements de populations bactériennes présentent une assez bonne répétabilité; le poids des racines et leur teneur en acides totaux semblent soumis à une relativement forte variabilité inter-rouissages et inter-échantillons; les teneurs en composés cyanés sont extrêmement dépendantes des conditions d'extraction; une part importante de la variabilité des teneurs en AGV provient probablement des conditions dans lesquelles ont été jusqu'à maintenant effectués les dosages.

2. PREMIERE SERIE D'ESSAIS: INFLUENCE DU MILIEU DE ROUISSAGE ET DE L'EPLUCHAGE PREALABLE DES RACINES.

2.1. Evolution de la teneur en matière sèche et du poids des racines.

En raison d'une importante variabilité inter-échantillons, il n'a pas été possible de mettre en évidence une influence des milieux de rouissage dans l'eau (rivière, étang, bac et fût) sur l'évolution de la teneur en matière sèche des racines rouies non épluchées; en revanche, en exprimant les teneurs en pourcentage de la teneur dans les échantillons témoins, on peut observer une diminution de la teneur en matière sèche au cours des deux premiers jours de rouissage, suivie d'une augmentation (fig 29). Par ailleurs, on constate qu'après deux jours d'égouttage, les pâtes résultant du défibrage des racines rouies ont une teneur en matière sèche pratiquement identique à celle des racines brutes.

Dans le cas de rouissage en sac, on observe, sauf lorsque les racines sont préalablement découpées en morceaux, une augmentation notable (environ 10%) de la teneur en matière sèche des racines (fig 30).

Aucun effet de l'épluchage préalable des racines n'a été observé au cours de l'essai 1C (fig 31).

Au cours des rouissages dans l'eau, le poids des racines évolue en sens inverse de la teneur en matière sèche: il commence par augmenter, puis il diminue à partir du troisième jour (fig 32); cette diminution est moins rapide dans la rivière que dans les autres milieux de rouissage.

L'épluchage préalable des racines ne modifie pas sensiblement l'évolution du poids des racines (fig 33).

Dans le cas d'un rouissage à sec, la perte de poids est progressive dès les premiers jours de rouissage et peut atteindre 10% après trois semaines.

2.2. Evolution des paramètres physico-chimiques dans les milieux de rouissage.

Les différents essais ont été effectués à une température ambiante moyenne de 24,8°C à l'heure des prélèvements (début de matinée). L'écart entre cette température ambiante et la température de l'eau des différents milieux de rouissage a toujours été trouvé inférieur à 2°C. Dans l'essai 1A, la température de l'eau contenue dans les bacs en ciment et dans les fûts en fer était de 1 à 2°C supérieure à celle de l'étang et de la rivière.

Le pH de l'eau au cours de cette première série d'essais n'ayant pas pu être pris avec un pHmètre suffisamment précis, il n'a pas été possible de mettre en évidence des différences au niveau des variations du pH au cours du rouissage; il semble toutefois que dans tous les milieux, y compris la rivière, il y ait eu une diminution du pH surtout marquée au cours des deux premiers jours de rouissage.

Fig 29: Influence du lieu de rouissage sur les variations de teneur en matière sèche des racines

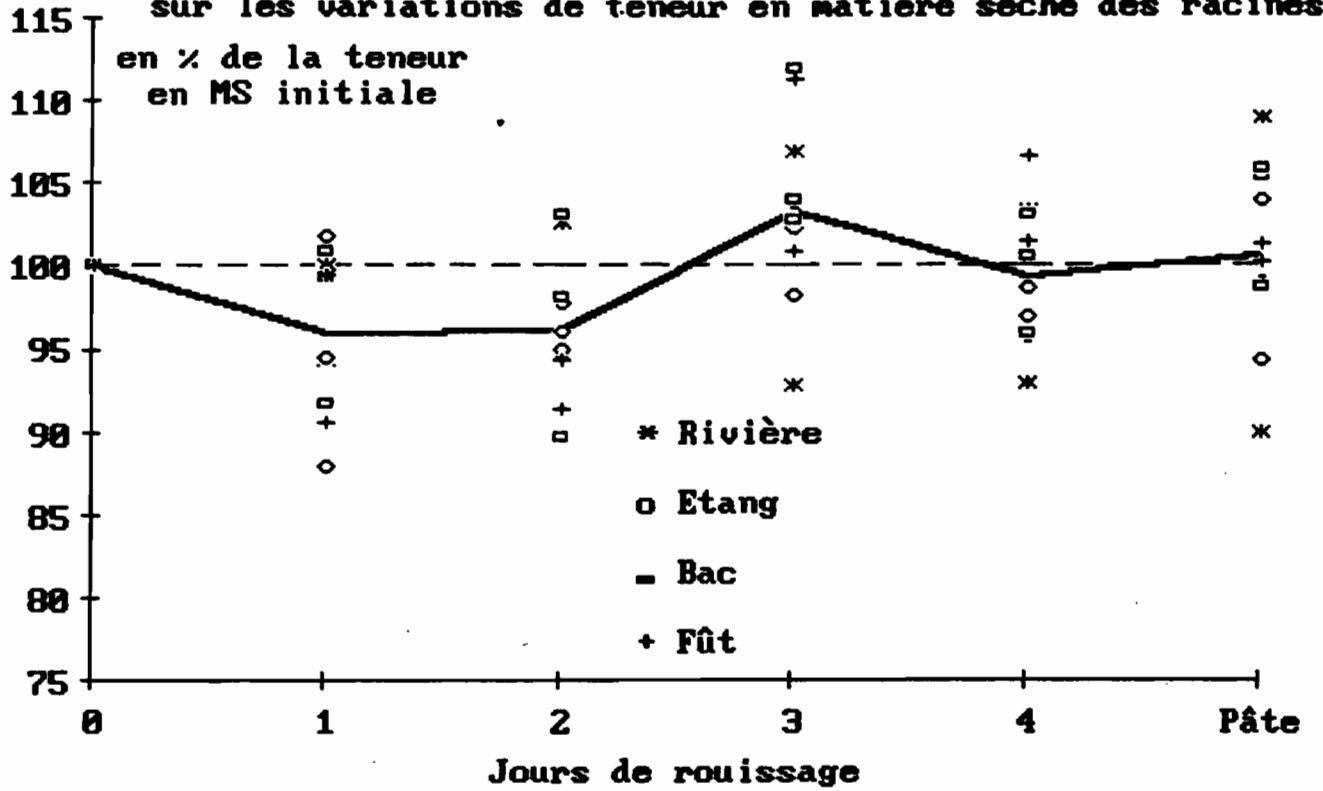


Fig 30: Influence des modalités de rouissage à sec sur les variations de teneur en matière sèche des racines

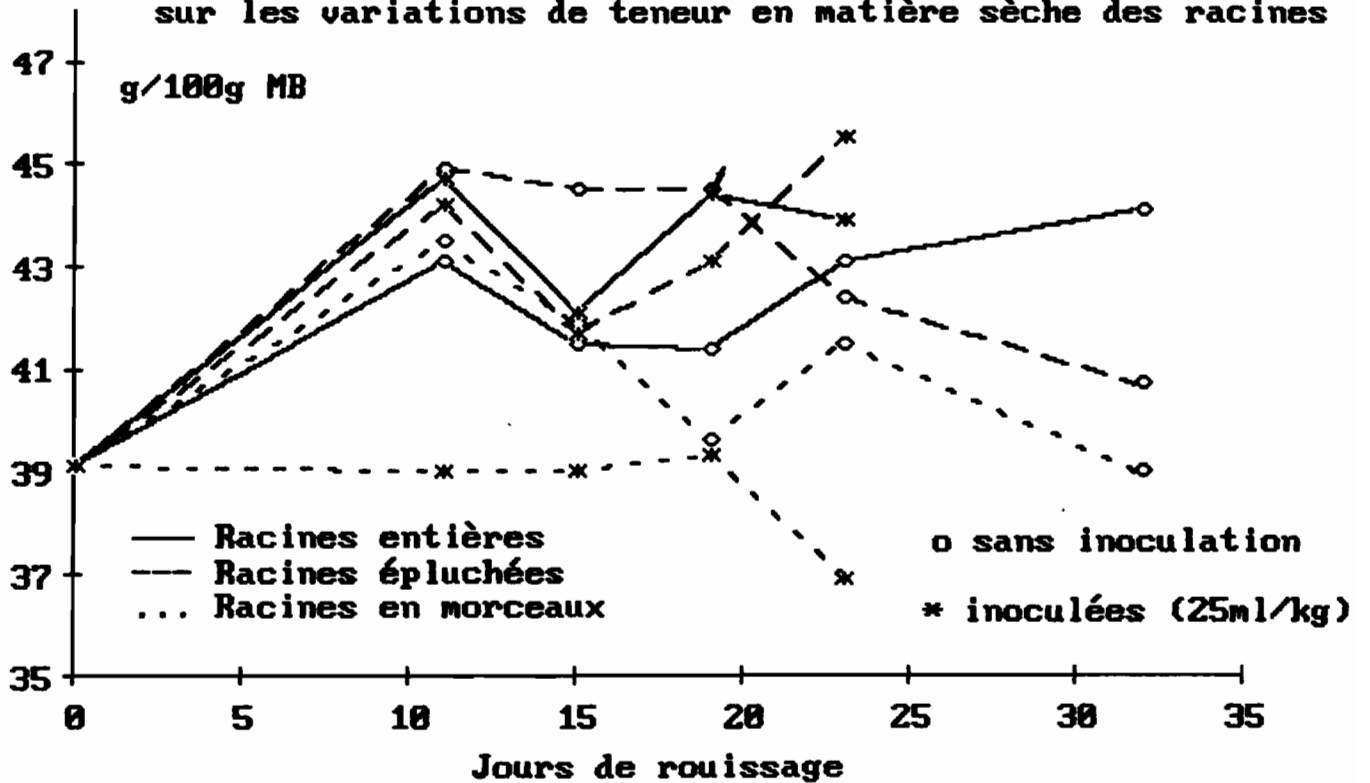


Fig 31: Influence du lieu de rouissage et de l'épluchage préalable des racines sur leurs variations de teneur en matière sèche

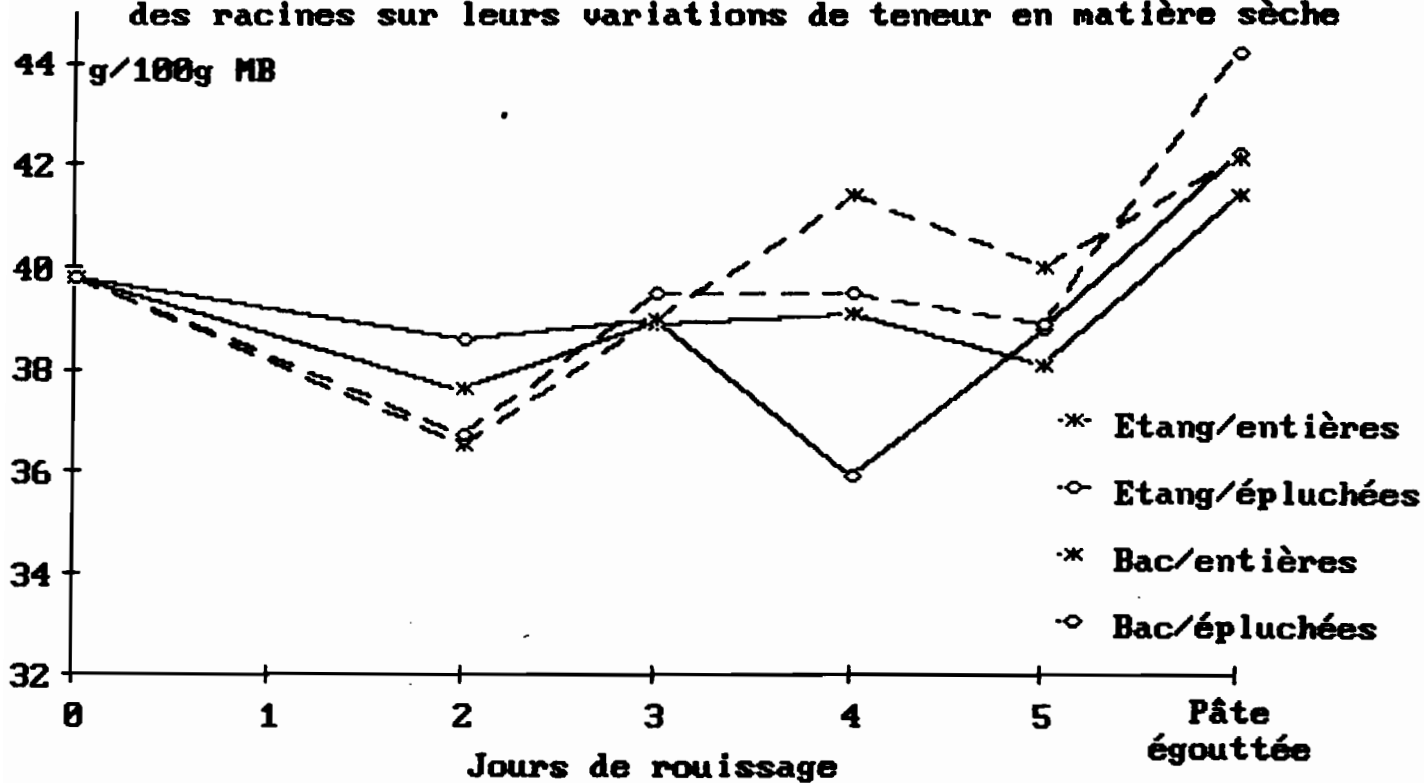


Fig 32: Influence du lieu de rouissage sur les variations de poids des racines

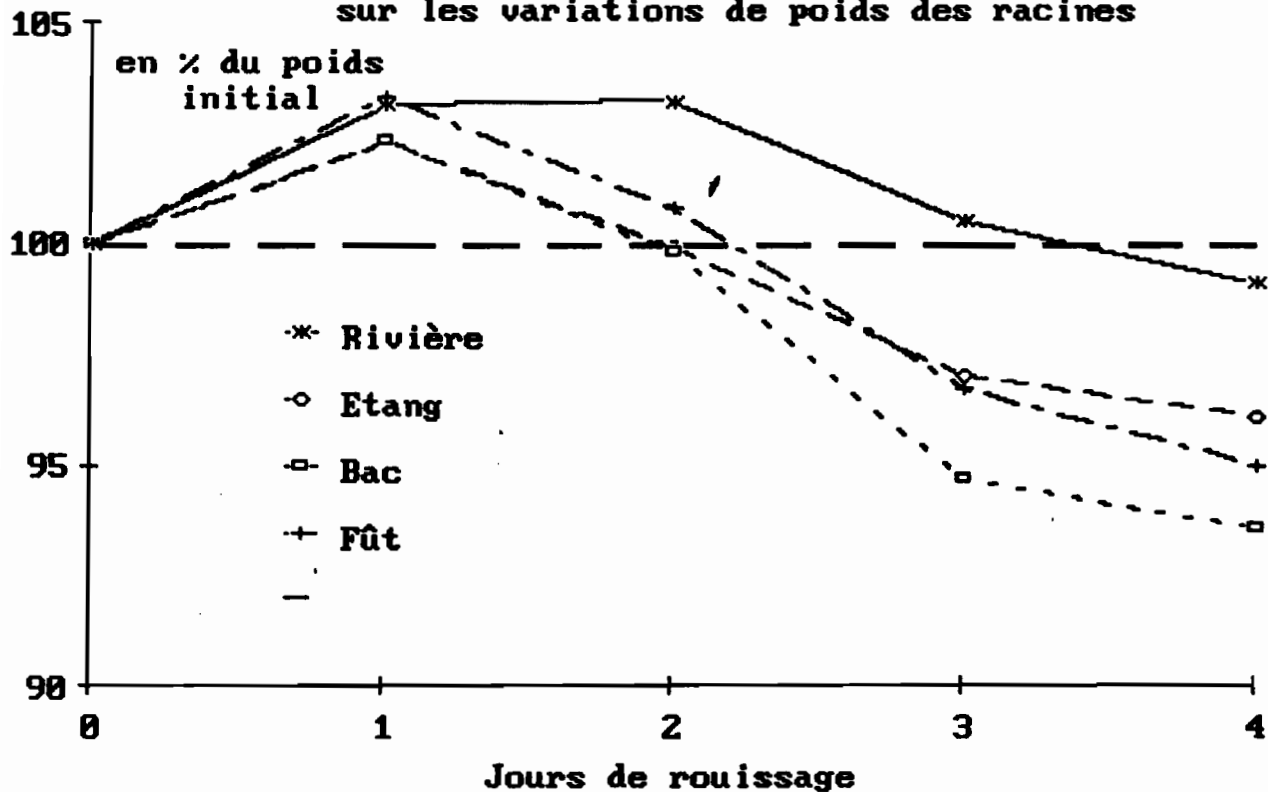
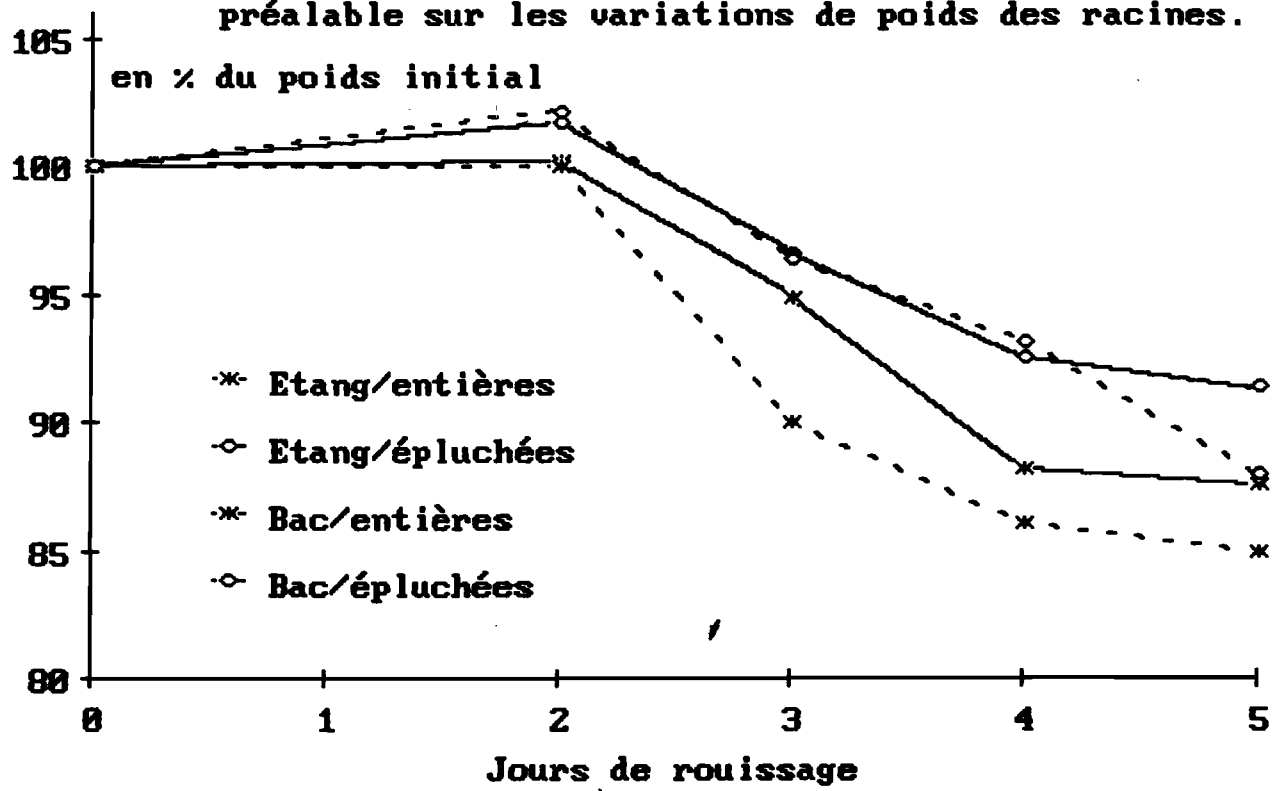


Fig 33: Influence du lieu de rouissage et de l'épluchage préalable sur les variations de poids des racines.



2.3. Evolution du pH et de l'acidité totale des racines.

Dans le cas de rouissage dans l'eau (Essai 1A), le pH et l'acidité totale des racines varient considérablement à partir du second jour (Fig 34 et 35): le pH passe de 7 à environ 4,5 en 5 jours; l'acidité totale passe de 3 à plus de 10 mmole/100g de matière sèche dans le même temps. Les variations semblent un peu moins rapides en rivière que dans les autres milieux de rouissage.

Dans le manioc rapé mis à rouir en sac, la diminution du pH et l'augmentation de l'acidité totale sont plus rapides; après 5 jours les valeurs sont comparables à celles obtenues au cours des rouissages dans l'eau.

Les essais en sacs (Fig 36 et 37) ont permis de constater:

- que le pH se stabilise à environ 4 après 10 jours de rouissage;
- que les variations enregistrées dans les racines entières étaient moins rapides que celles mesurées pour les racines épluchées ou coupées en morceaux;
- que l'ensemencement des racines par du jus d'un rouissage précédent accélérât l'augmentation de l'acidité totale des racines;
- qu'après 20 jours de rouissage, durée à partir de laquelle les racines présentent un ramollissement comparable à celui de racines rouies 4 à 5 jours dans l'eau, l'acidité totale des racines rouies à sec est environ 3 fois plus importante que celle des racines rouies dans l'eau.

L'essai 1C a mis en évidence un effet accélérateur de l'épluchage des racines sur les variations de pH et d'acidité totale des racines (fig 38 et 39); il a également permis de constater que les variations étaient un peu plus rapides en étang qu'en bac en ciment; dans l'ensemble les évolutions observées sont très proches de celles enregistrées au cours de l'essai 1A.

Dans les pâtes obtenues après défibrage et égouttage des racines rouies, les valeurs du pH ont toujours été trouvées comprises entre 3,6 et 4,0 dans le cas de rouissage dans l'eau et entre 4,0 et 4,3 dans le cas de rouissage à sec.

2.4. Evolution des teneurs en composés cyanés.

L'évolution des teneurs en cyanures liés aux glucosides, des teneurs en cyanhydrines et des teneurs en cyanures libres au cours de l'essai 1A montre (Fig 40):

- que les glucosides cyanogénétiques sont presque entièrement décomposés après 4 jours d'immersion des racines dans l'eau, la décomposition étant surtout importante à partir du 3ème jour.
- que la décomposition a été plus rapide en bac en ciment que dans les autres milieux;
- que la décomposition des glucosides a été aussi rapide pour le manioc rapé mis à fermenter en sac que pour les racines mises à rouir dans l'eau; toutefois, après 5 jours, on retrouve des quantités importantes de cyanures, essentiellement sous forme de cyanhydrines, dans le manioc rapé en sac.

Au cours des rouissages en sac (fig 41), la plus grande partie des glucosides est décomposée après 10 jours, mais les teneurs résiduelles en cyanures libres et en cyanhydrines sont plus importantes après 30 jours de rouissage en sac qu'après 5 jours de rouissage dans l'eau. On constate, par ailleurs, que la détoxification est beaucoup moins rapide lorsque les racines sont mises à rouir non épluchées.

Les mesures effectuées au cours de l'essai 1C (Fig 42) confirment dans le cas de rouissage dans l'eau, l'effet favorable de l'épluchage des racines sur la vitesse de détoxification; en revanche, peu de différences ont été observées entre les deux milieux de rouissage.

Fig 34: Influence du lieu de rouissage sur les variations de pH des racines

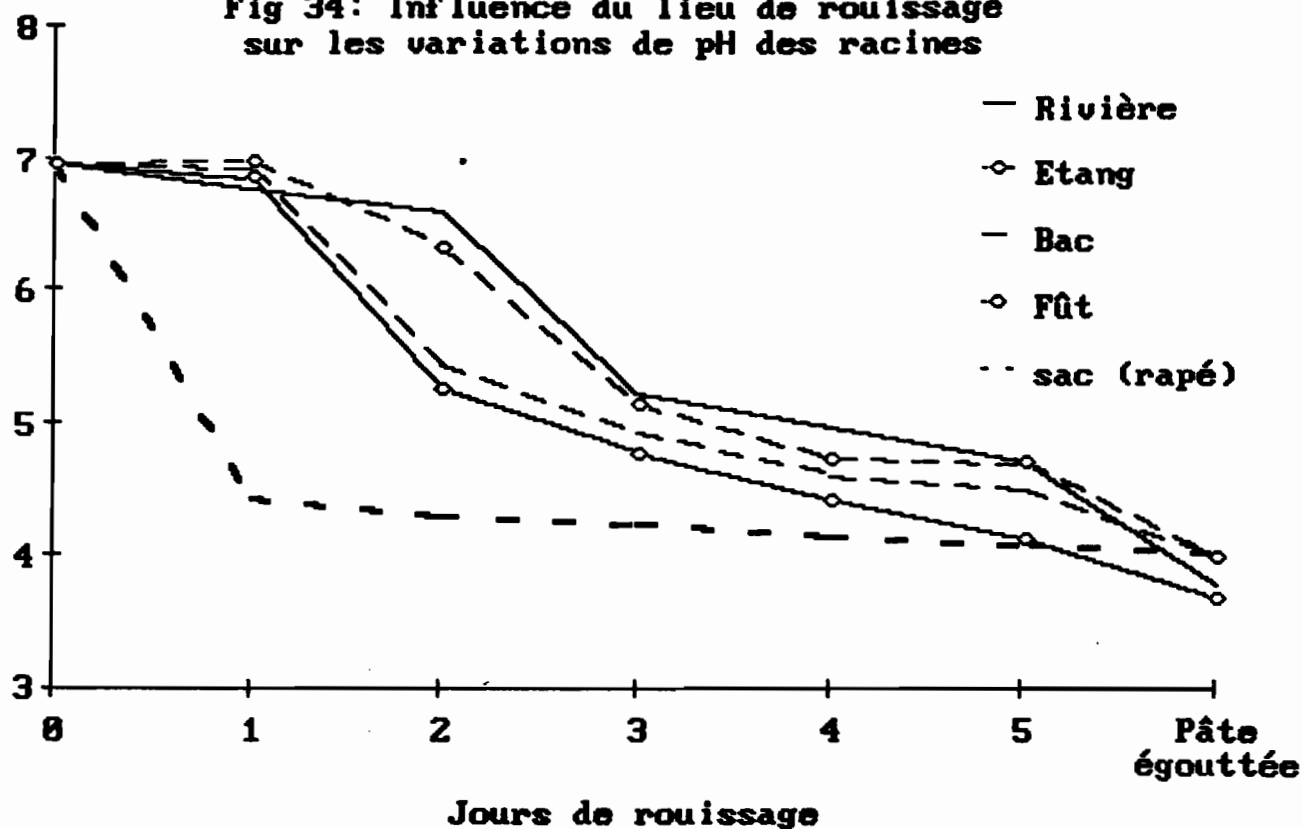


Fig 35: Influence du lieu de rouissage sur les variations de l'acidité totale des racines

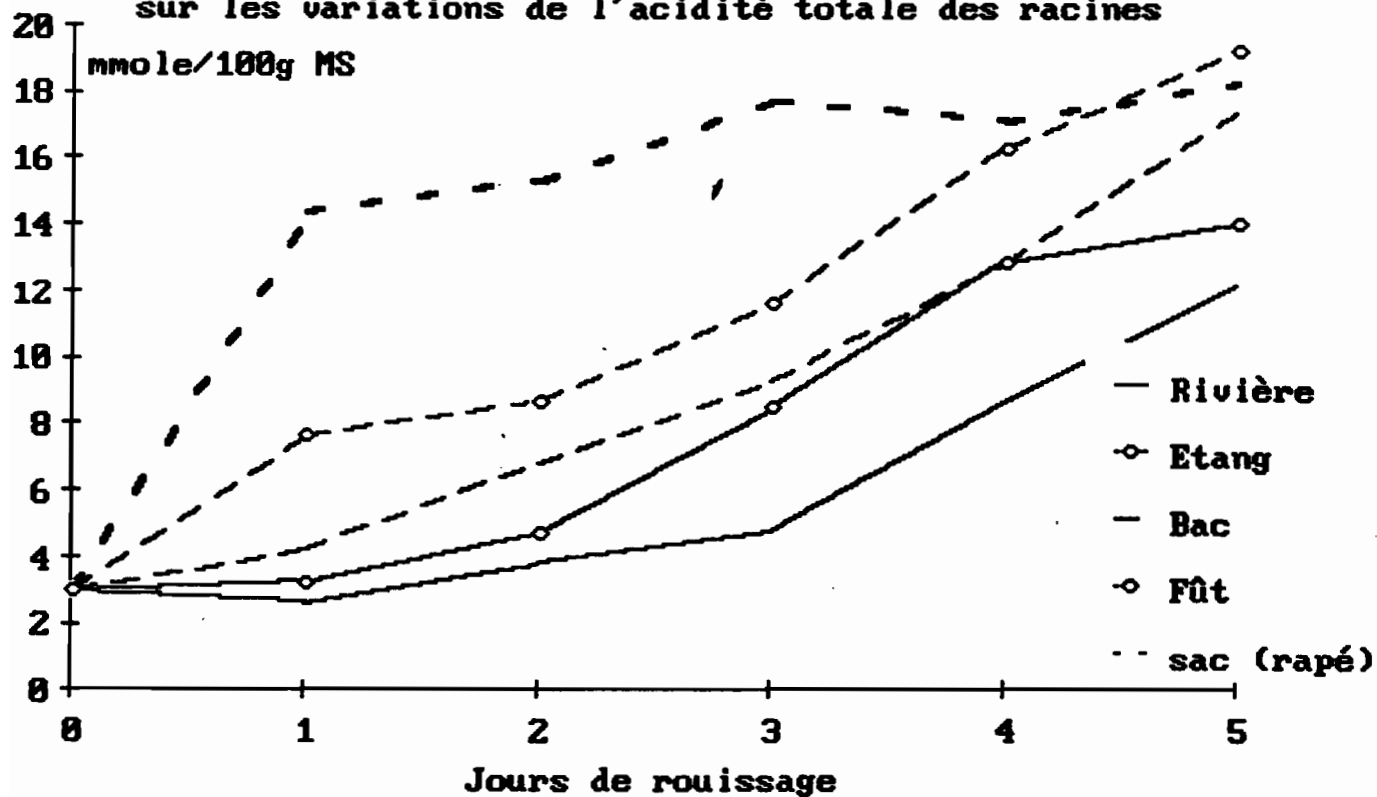


Fig 36: Influence des modalités de rouissage à sec sur les variations de pH des racines

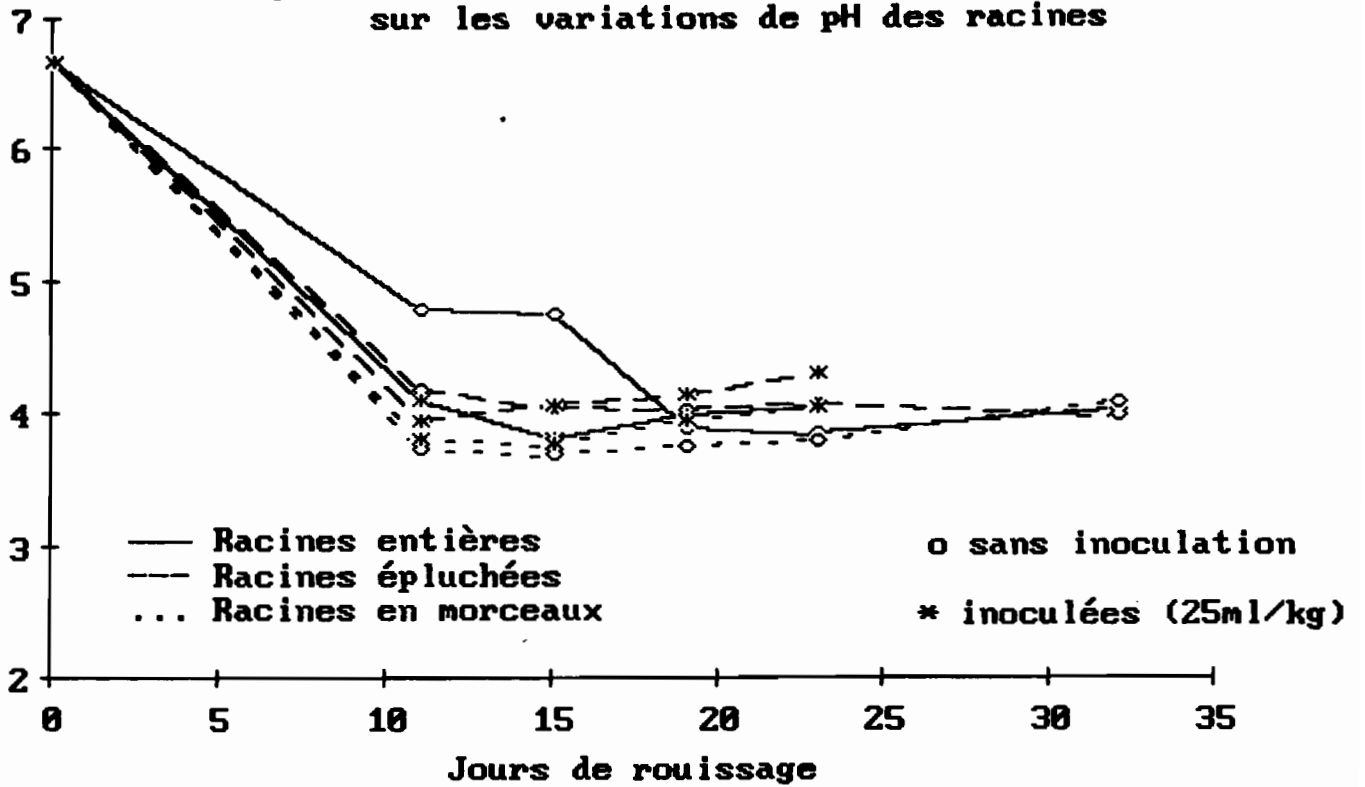


Fig 37: Influence des modalités de rouissage à sec sur les variations de l'acidité totale des racines

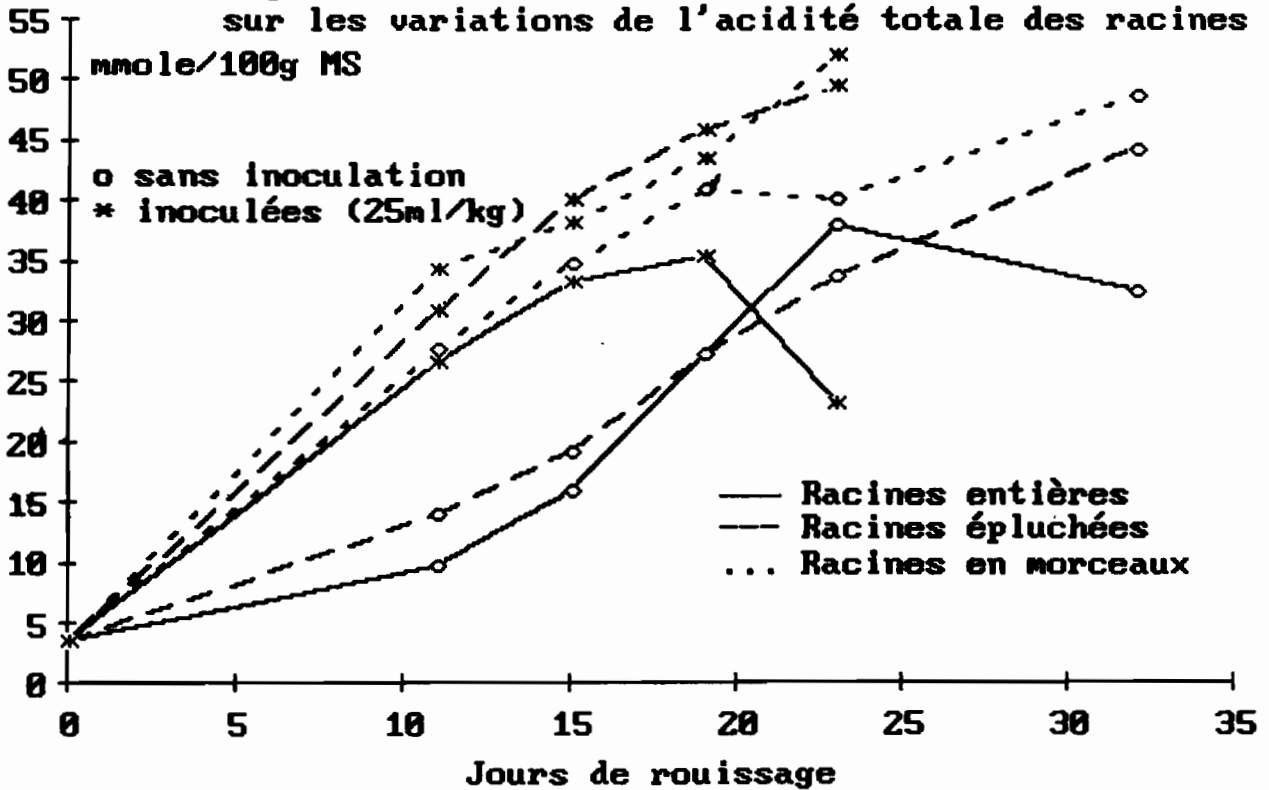


Fig 38: Influence du lieu de rouissage et de l'épluchage préalable sur les variations du pH des racines.

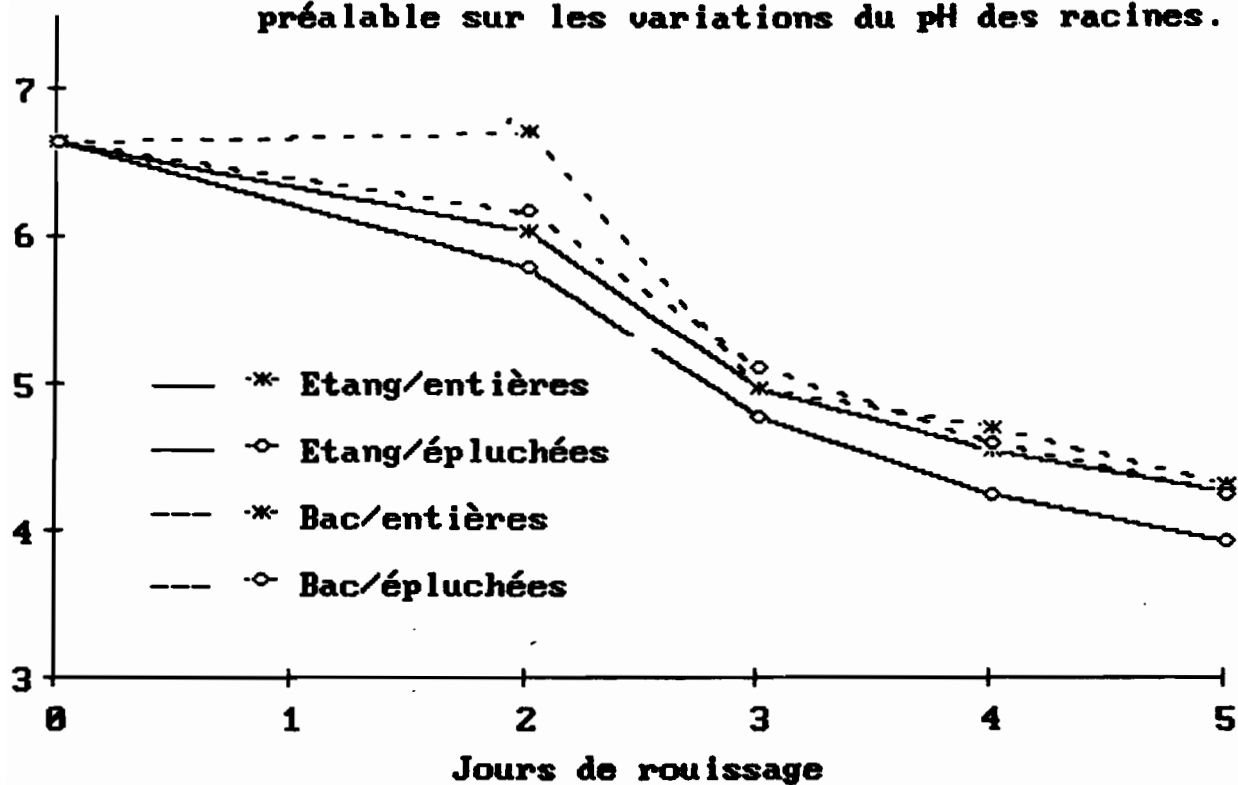
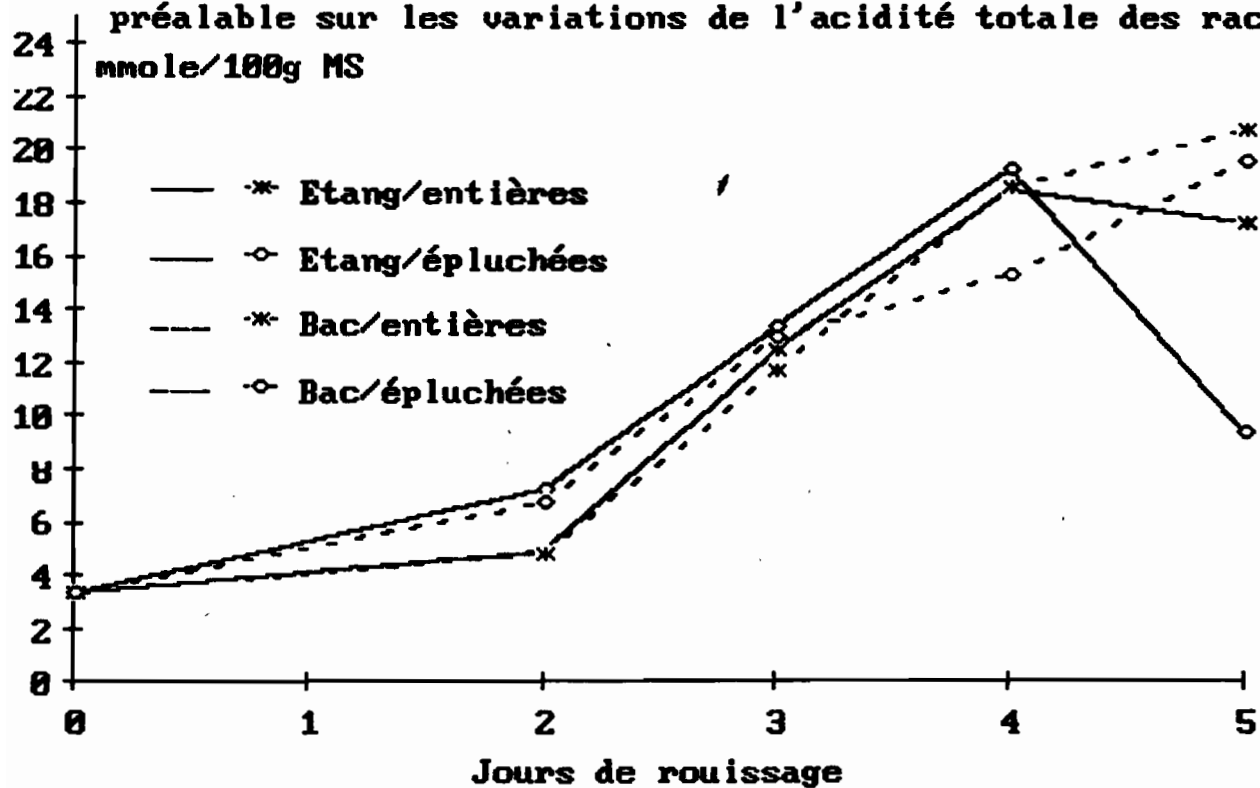


Fig 39: Influence du lieu de rouissage et de l'épluchage préalable sur les variations de l'acidité totale des racines.



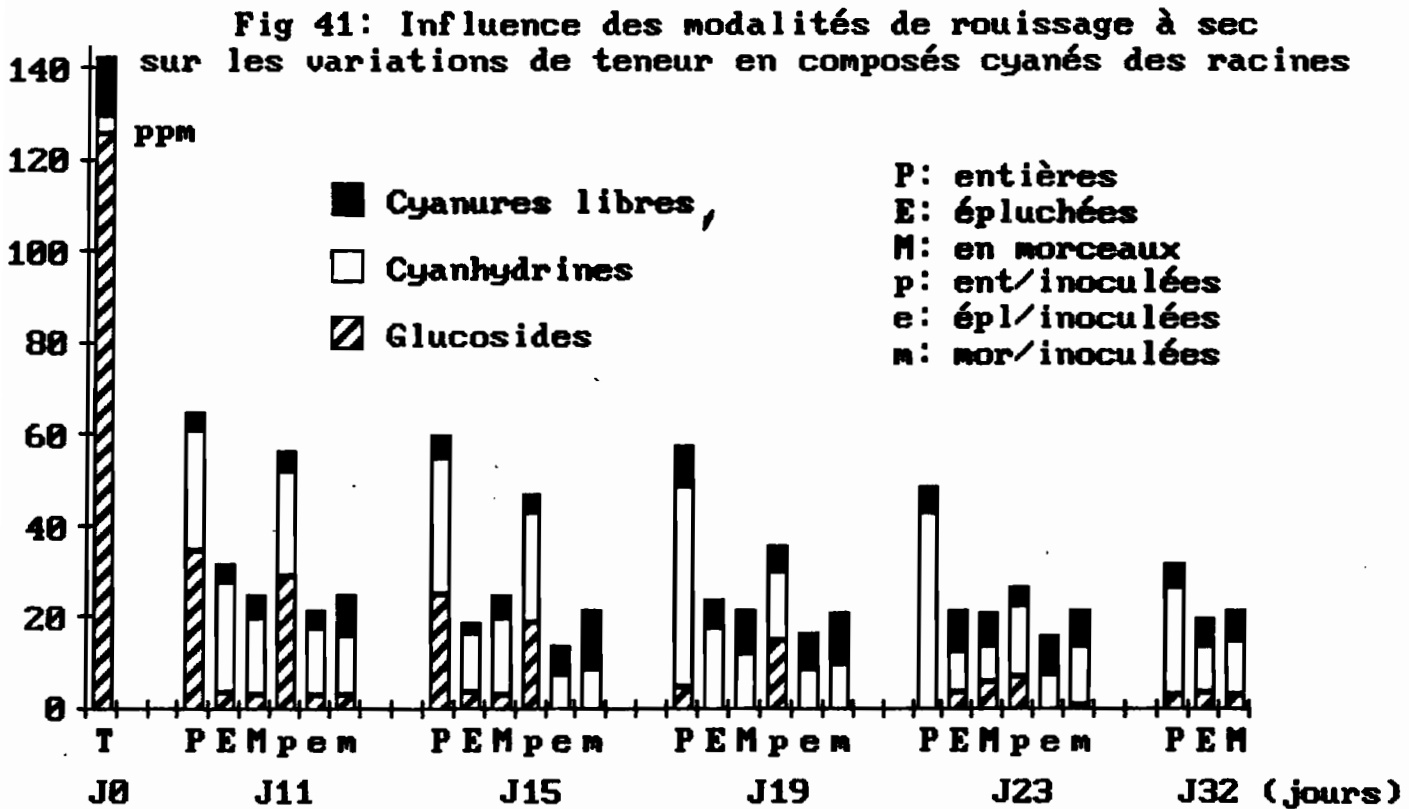
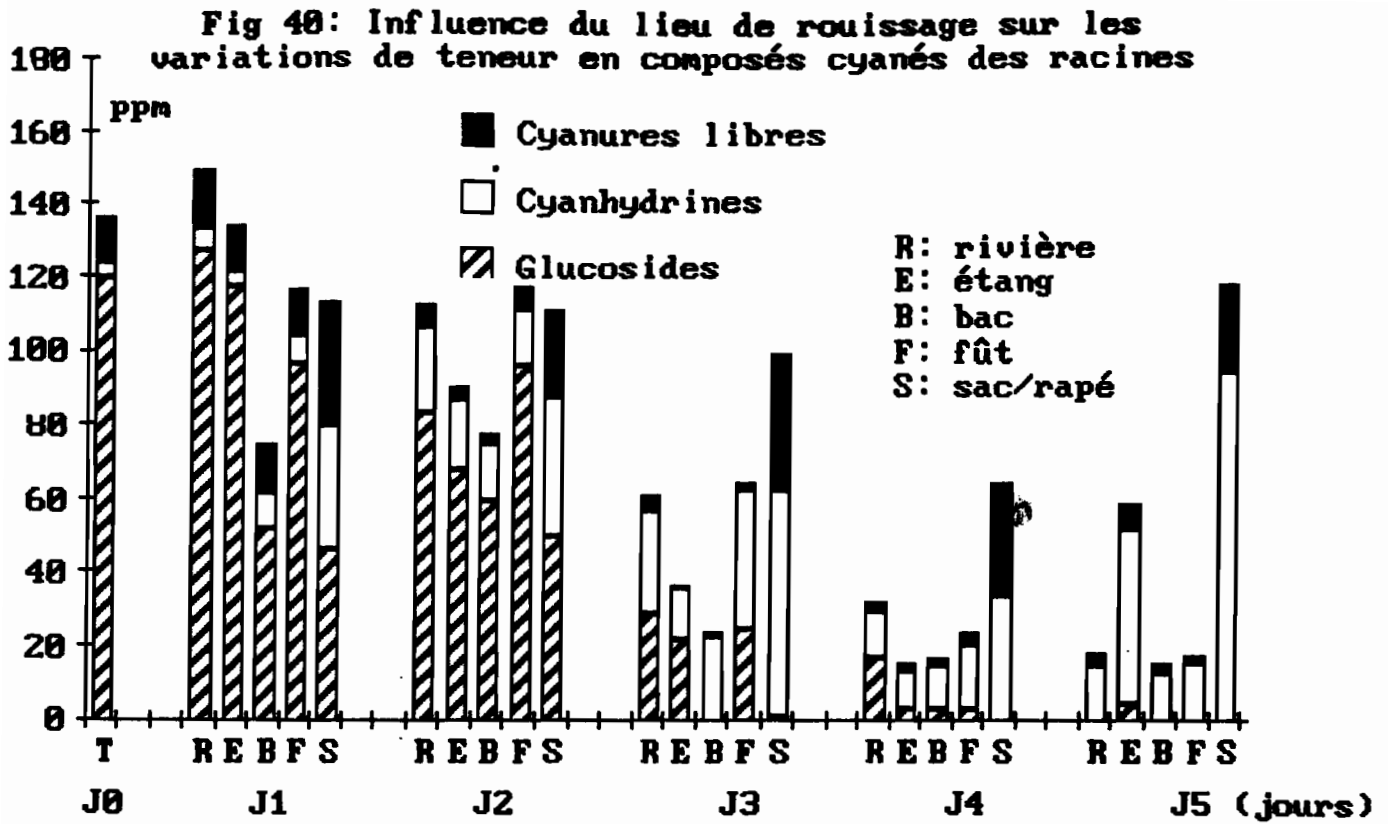
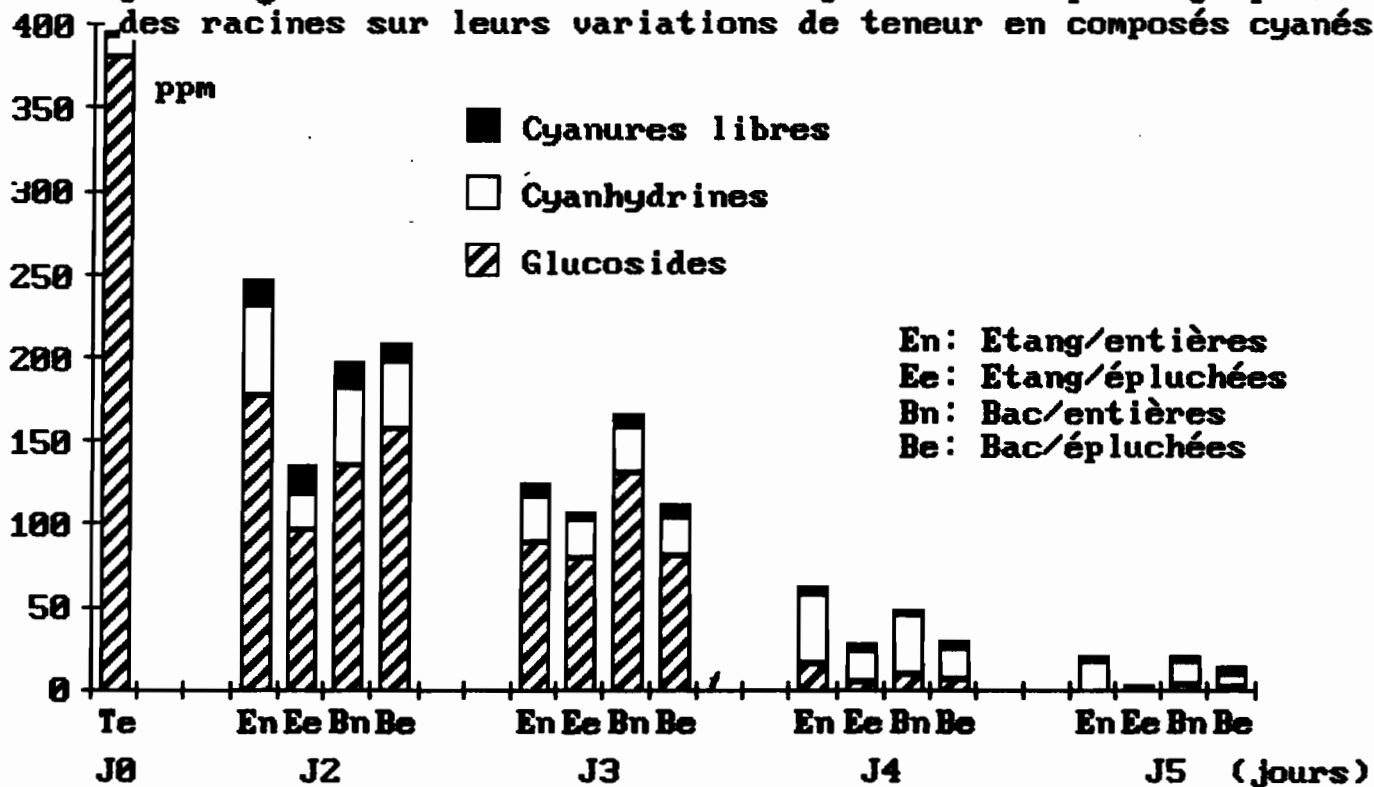


Fig 42: Influence du lieu de rouissage et de l'épluchage préalable des racines sur leurs variations de teneur en composés cyanés.



Signalons que dans les pâtes obtenues après défibrage et égouttage des racines rouies, les teneurs résiduelles en cyanures totaux se sont situées entre 1 et 3,5 ppm dans tous les cas, sauf dans celui de la fermentation en sac de manioc rapé (14 ppm).

2.5. Evolution des teneurs en acide lactique et en acides gras volatils.

Quel que soit le lieu de rouissage dans l'eau (essai 1A), l'évolution des teneurs est quasiment identique (fig 43): l'acide lactique et l'acide acétique sont les premiers acides produits au cours de la fermentation; à partir du deuxième jour, la fermentation est de type acéto-butyrique; l'acide propionique n'est produit qu'à partir du troisième jour. En fin de rouissage, l'acide lactique et l'acide butyrique sont quantitativement les plus importants.

La fermentation du manioc rapé en sac se distingue notablement par l'importance de la production d'acide acétique et d'acide lactique et par l'absence de production d'acide propionique et d'acide butyrique; la baisse très rapide du pH rendant impossible la croissance de *Clostridium butyricum* pourrait en être la cause.

Au cours du rouissage en sac de racines entières ou de morceaux de racines (essai 1B), on observe (fig 44), comme pour le manioc rapé, une production beaucoup plus importante d'acide acétique et d'acide lactique et une production beaucoup plus faible d'acide propionique. Les teneurs sont sensiblement supérieures dans les sacs contenant les racines inoculées et inférieures dans les sacs contenant les racines non préalablement épluchées.

Les variations observées au cours de l'essai 1C (fig 45) sont comparables à celles mesurées au cours de l'essai 1A; aucun effet notable, ni du lieu de rouissage, étang ou bac, ni de l'épluchage préalable des racines n'a été mis en évidence.

Le type de fermentation est, dans tous les cas, sans contestation possible du type hétéro-lactique. On constate des différences importantes entre rouissage dans l'eau et rouissage à sec: pour des stades de ramollissement comparables, les rouissages en sac s'accompagnent d'une production plus élevée d'acide acétique mais beaucoup plus faible d'acides butyrique et propionique que les rouissages dans l'eau.

Si l'on compare les teneurs en acide lactique et en AGV des pâtes obtenues après défibrage et égouttage des racines rouies, on observe que les différences entre rouissage dans l'eau et rouissage à sec ne subsistent de façon notable que pour l'acide acétique: les valeurs moyennes sont respectivement pour les 8 rouissages dans l'eau et les 7 rouissages en sac étudiés: 0,405 et 0,436 g/100g MS pour l'acide lactique; 0,076 et 0,128 pour l'acide acétique; 0,033 et 0,046 pour l'acide propionique; 0,0305 et 0,032 pour l'acide butyrique. Ces valeurs sont notablement plus faibles que celles trouvées dans les racines en fin de rouissage ce qui traduit des pertes importantes au cours de la décantation qui accompagne le défibrage.

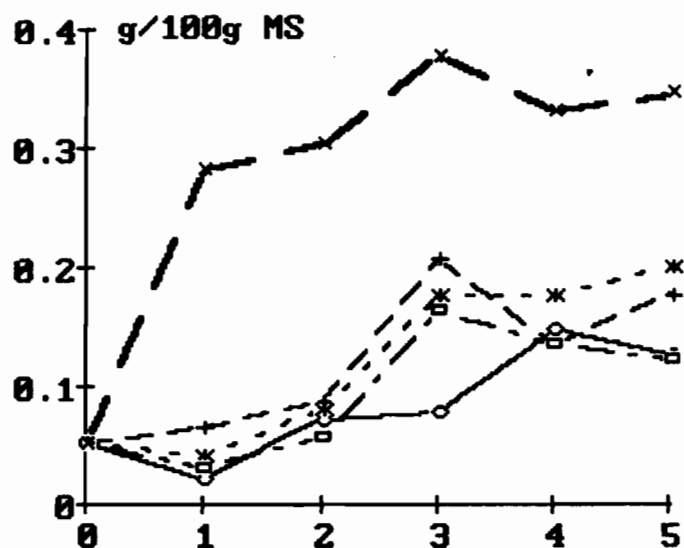
2.6. Bilans massiques des transformations en fougou et chikwanges.

Les rendements bruts à l'issue de l'épluchage et du rouissage ainsi que les bilans massiques de la transformation en farine et en chicouangue sur la base de la matière brute et de la matière sèche sont donnés dans les tableaux 1 à 3.

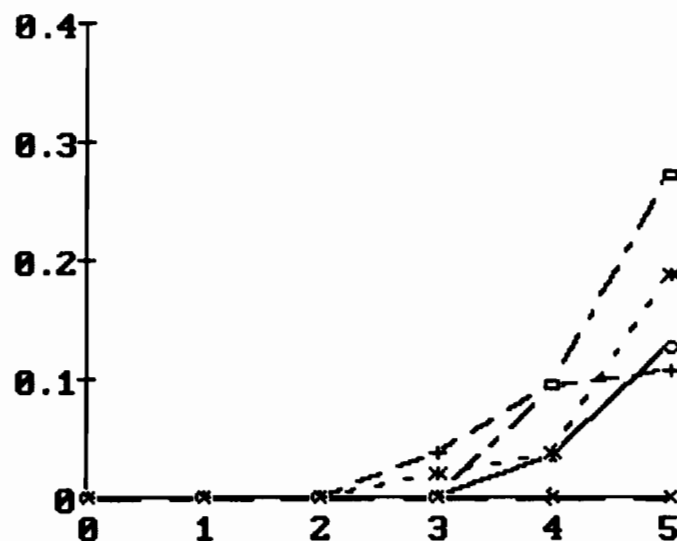
On constate principalement que:

- les rendements bruts à l'issue de l'épluchage et du rouissage se situent entre 70 et 80%; l'épluchage préalable des racines permet dans la plupart des cas d'obtenir de meilleurs rendements. Les rendements sont

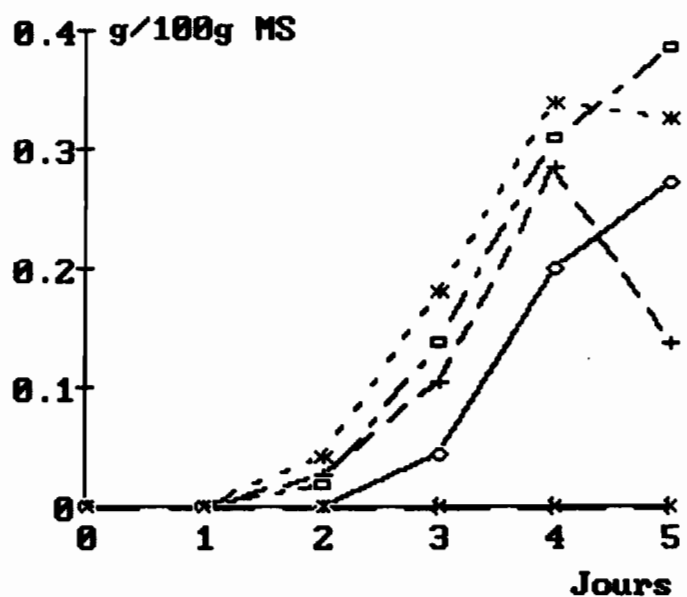
ACIDE ACETIQUE



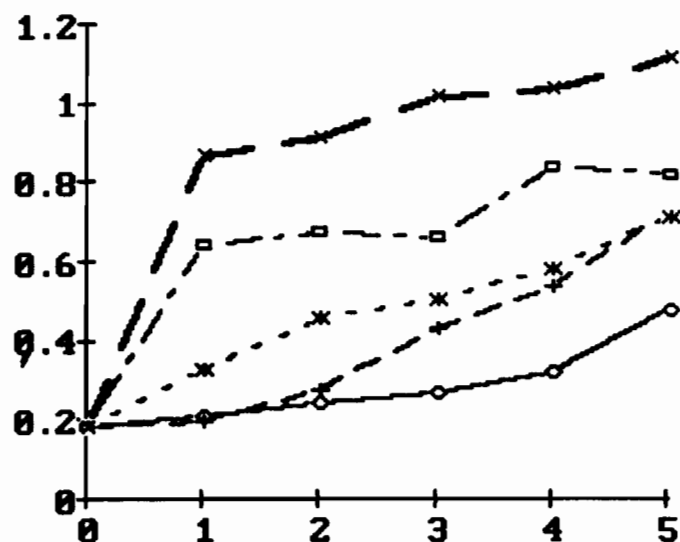
ACIDE PROPIONIQUE



ACIDE BUTYRIQUE



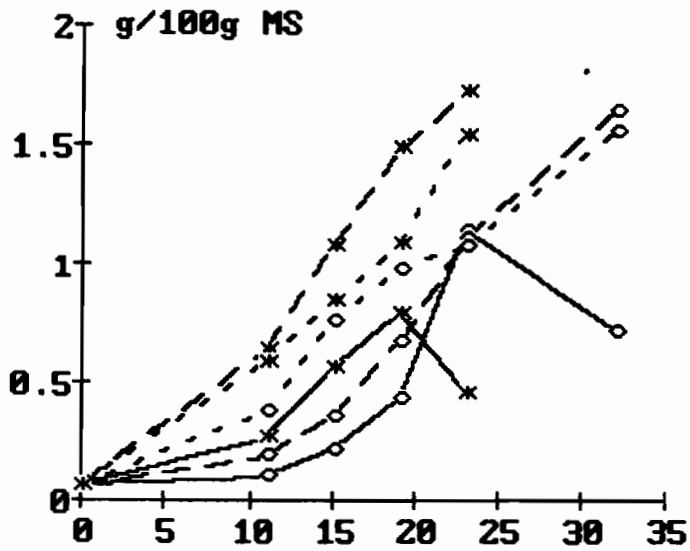
ACIDE L-LACTIQUE



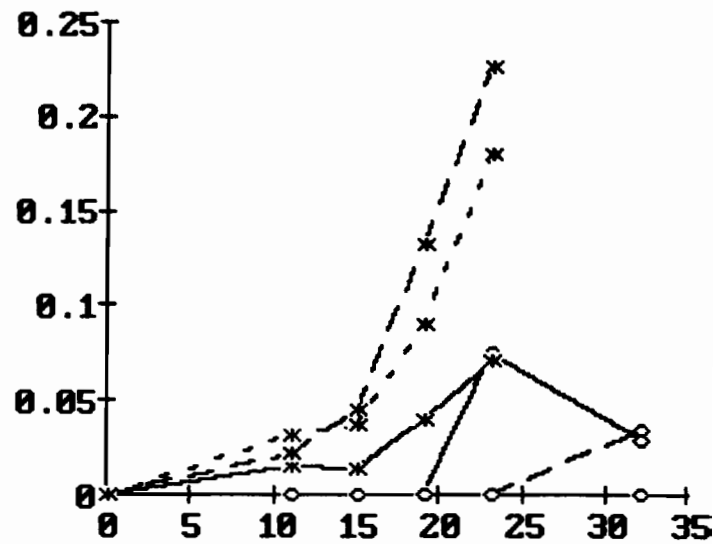
- Rivière
- + Etang
- * Bac en ciment
- Fût
- * sac (rapé)

Fig 43: Influence du lieu de rouissage sur les variations de teneurs en acide lactique et en acides gras volatils

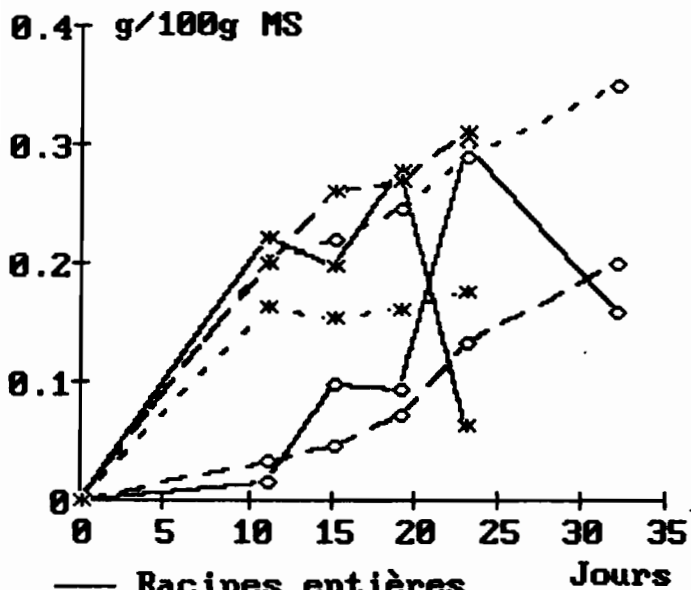
ACIDE ACETIQUE



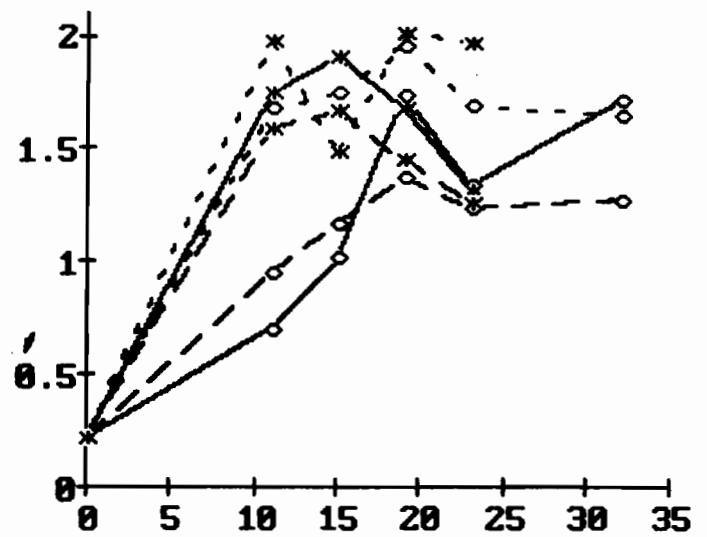
ACIDE PROPIONIQUE



ACIDE BUTYRIQUE



ACIDE L-LACTIQUE

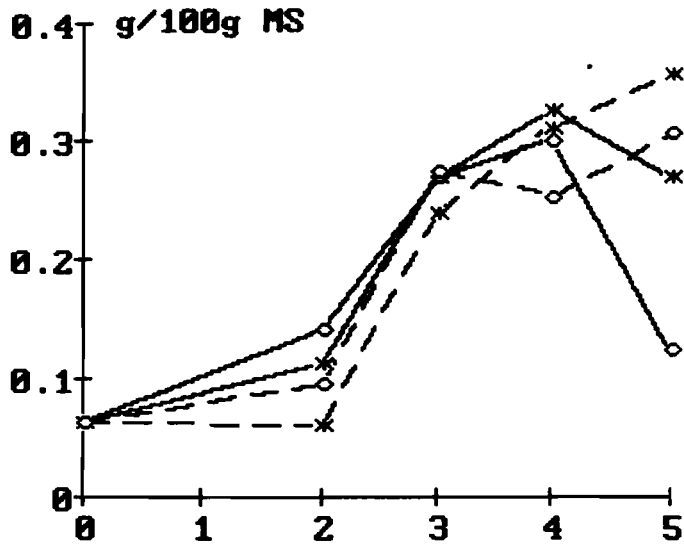


— Racines entières
 --- Racines épluchées
 ... Racines en morceaux

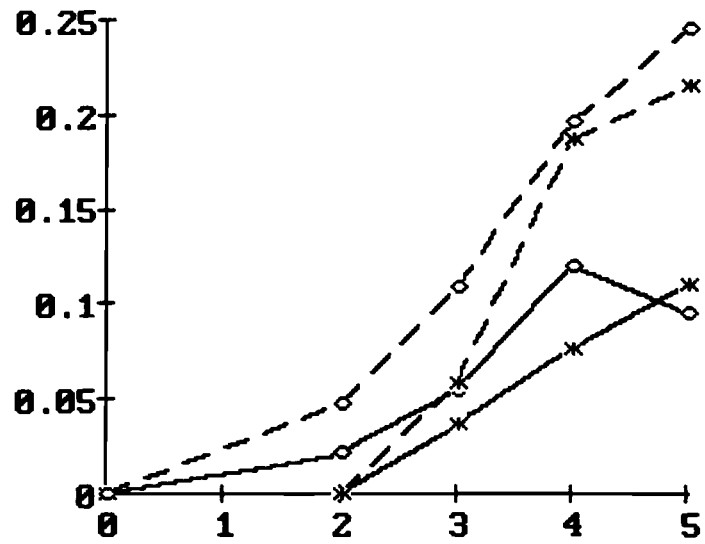
o sans inoculation
 * inoculées (25ml/kg)

Fig 44: Influence des modalités de rouissage à sec sur les variations de teneurs en acide lactique et en acides gras volatils des racines

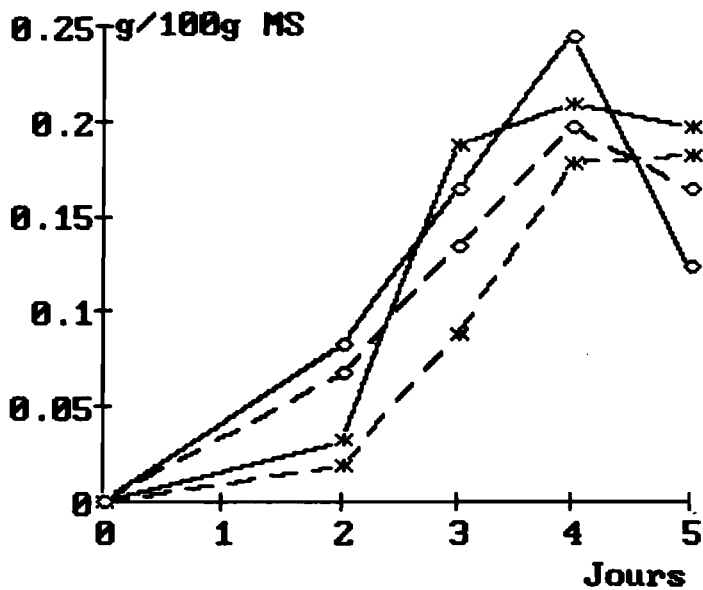
ACIDE ACETIQUE



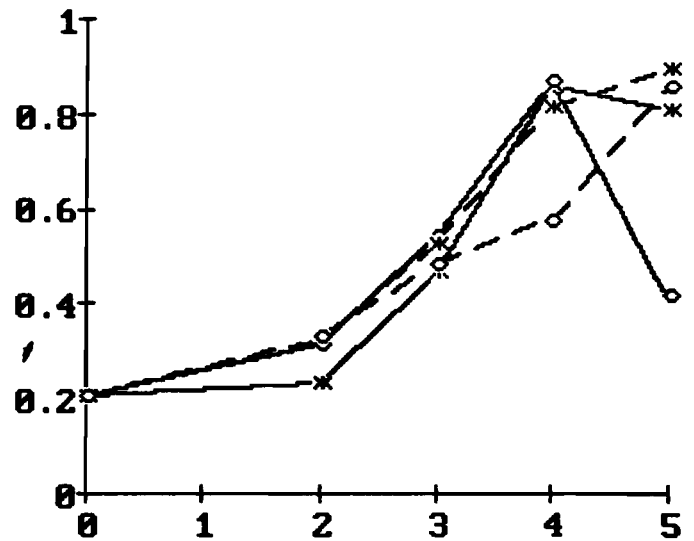
ACIDE PROPIONIQUE



ACIDE BUTYRIQUE



ACIDE L-LACTIQUE



- * Etang/entières
- o Etang/épluchées
- * Bac/entières
- o Bac/épluchées

Fig 45: Influence du lieu de rouissage et de l'épluchage préalable des racines sur les variations de leurs teneurs en acide lactique et en acides gras volatils

également influencés par le mode et la durée de rouissage: les pertes sont plus importantes pour les racines ayant atteint un stade de ramollissement trop avancé et pour les racines insuffisamment ramollies lorsqu'elles sont épluchées après rouissage.

TABLEAU 1: Influence du lieu de rouissage sur les bilans massiques des transformations en farine et en chikwangue (essai 1A).

Lieu de rouissage	Rendement brut de l'épluchage /rouissage		Transformation en farine		Transformation en chikwangue	
	(a)	(b)	Rdt brut (c)	Rdt réel(d)	Rdt brut (c)	Rdt réel(d)
Rivière	75,7	71,4	32,2	77,1	41,2	48,0
Etang	78,1	80,1	34,5	83,1	51,9	58,4
Bac	74,6	79,6	36,7	67,3	48,2	54,8
Fût	79,1	77,6	33,2	79,2	48,0	55,8
sac (rapé)	81,6	81,6	37,9	87,1	29,9	27,8

- (a) Poids racines rouies et épluchées/poids des rac. brutes (3j de rouissage).
 (b) Poids racines rouies et épluchées/poids des rac. brutes (5j de rouissage).
 (c) Poids de farine ou de chikwangue / poids des racines brutes.
 (d) Quantité de matière sèche obtenue / Quantité de matière sèche comestible dans les racines brutes.

TABLEAU 2: Influence des modalités de rouissage en sac sur les bilans massiques des transformations en farine et en chikwangue (essai 1B).

Modalités de rouissage	Rendement brut de l'épluchage /rouissage		Transformation en farine		Transformation en chikwangue	
	(a)	(b)	Rdt brut (c)	Rdt réel(d)	Rdt brut (c)	Rdt réel(d)
Entières/ni	72,7	73,5	32,7	86,2	22,2	27,0
Epluchées/ni	77,7	77,3	37,7	99,9	13,2	16,0
Morceaux/ni	78,3	76,8	36,6	97,4	39,2	46,4
Entières/ic	73,1	73,0	33,1	88,6	52,7	66,3
Epluchées/ic	75,7	74,2	34,5	91,4	50,7	63,9
Morceaux/ic	76,1	78,1	36,5	96,7	64,7	66,5

- (a) Poids racines rouies et épluchées/poids des rac. brutes (15j de rouissage).
 (b) Poids racines rouies et épluchées/poids des rac. brutes (23j de rouissage pour les racines inoculées; 32 jours pour les racines non inoculées).
 (c) Poids de farine ou de chikwangue / poids des racines brutes.
 (d) Quantité de matière sèche obtenue / Quantité de matière sèche comestible dans les racines brutes.

ni: non inoculées - ic: inoculées (25ml/kg d'un jus de rouissage précédent)

- lorsque les transformations se déroulent dans des conditions favorables, les quantités de farine obtenues représentent environ le tiers du poids des racines traitées alors que celles de chikwangu en représentent environ la moitié.
- la transformation en farine permet de récupérer, dans de bonnes conditions, plus de 90% de la matière sèche comestible des racines. En revanche, les bilans massiques sur la base de la matière sèche pour la transformation en chikwangu sont plus faibles: dans la plupart des cas, plus de 40% de la matière sèche comestible est perdue.
- les bilans massiques de la transformation en chikwangu subissent des variations importantes qui sont essentiellement dues à l'étape de défibrage: lorsque les racines sont insuffisamment ramollies ou sous des formes (Ex: rapé) se prêtant mal à la technique de défibrage traditionnelle les pertes peuvent dépasser 80%.

TABLEAU 3: Influence du lieu de rouissage et de l'épluchage préalable des racines sur le bilan massique des transformations en farine et en chikwangu (essai 1C).

Modalités de rouissage	Rendement brut de l'épluchage /rouissage		Transformation en farine		Transformation en chikwangu	
	(a)	(b)	Rdt brut (c)	Rdt réel(d)	Rdt brut (c)	Rdt réel(d)
Etang/ent.	72,2	72,8	28,5	70,6	33,7	40,6
Etang/épl.	73,0	69,1	29,8	75,0	36,7	44,8
Bac/entières	72,5	73,4	30,3	75,6	27,9	34,6
Bac/épluch.	77,1	74,1	32,4	80,6	32,1	39,8

- (a) Poids racines rouies et épluchées/poids des rac. brutes (3j de rouissage).
 (b) Poids racines rouies et épluchées/poids des rac. brutes (5j de rouissage).
 (c) Poids de farine ou de chikwangu / poids des racines brutes.
 (d) Quantité de matière sèche obtenue / Quantité de matière sèche comestible dans les racines brutes.

2.7. Influence des modalités de rouissage sur les qualités organoleptiques des produits finis (foufou, chikwangu).

Les résultats des tests de différenciation, de caractérisation et de préférence sont donnés dans les tableaux 4 à 8 pour les farines et les tableaux 9 à 12 pour les chikwangs.

Le lieu de rouissage peut influencer la couleur des foufous (tab 4): au cours de l'essai 1A les panélistes ont jugé le foufou provenant de racines rouies en rivière plus clair que ceux élaborés à partir de racines rouies en étang, en bac en ciment ou en fût en fer.

Le foufou produit à partir des racines rapées mises en sac a été jugé inférieur à ceux produits à partir de racines rouies en étang ou en rivière (tab 5).

Dans le cas de rouissages en sac (tab 6), les foufous provenant de racines rouies non épluchées ont été moins appréciés, essentiellement en raison de leur couleur, que ceux élaborés à partir de racines rouies épluchées ou découpées en morceaux.

		Comparaison: A: Rivière B: Etang			Comparaison: A: Rivière C: Bac			Comparaison: A: Rivière D: Fût			Comparaison: B: Etang C: Bac			Comparaison: B: Etang D: Fût			Comparaison: C: Bac D: Fût		
Nombre de panélistes		11			11			11			11			11			11		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		10			11			11			5			8			1		
Niveau de signification du test 2/5		P<0,05			P<0,05			P<0,05			P<0,05			P<0,05			n.s.		
		A	B	NdS	A	C	NdS	A	D	NdS	B	C	NdS	B	D	NdS	C	D	NdS
Couleur	la plus claire:	10	0	1%	11	0	1%	11	0	1%	4	0		5	3		0	1	
	la plus appréciée:	10	0	1%	11	0	1%	11	0	1%	4	0		2	6		0	1	
Odeur	la plus forte:	4	6		5	6		1	10	5%	0	4		3	5		1	0	
	la plus appréciée:	6	4		4	7		3	8		2	2		2	6		0	1	
Goût	le plus fort:	6	4		5	5		7	3		3	1		4	4		0	1	
	le plus apprécié:	5	4		6	4		11	0	1%	4	0		6	2		0	1	
Acidité	la plus forte:	0	0		0	0		0	0		0	0		1	0		0	0	
	la plus appréciée:	0	0		1	0		0	0		0	0		0	0		0	0	
Consistance	la plus élastique:	9	0	1%	10	0	1%	7	1		3	0		4	2	1%	0	1	
	+ appréciée (main)	5	5		8	3		9	2		4	0		6	2		0	1	
	+ appréciée (bouche)	4	6		4	6		9	2		3	1		6	2	5%	1	0	
Impression générale		5	5		6	5		11	0	1%	4	0		6	2		0	1	

NdS: Niveau de signification.

**TABEAU 4 INFLUENCE DU LIEU DE ROUISSAGE (RIVIERE / ETANG / BAC EN CIMENT / FUT EN FER)
SUR LES CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES DU FOUFOU (2ème essai)**

		Comparaison: A: Rivière E: rapé, en sac			Comparaison: B: Etang E: rapé, en sac			Comparaison: C: Bac E: rapé, en sac			Comparaison: D: Fût E: rapé en sac		
Nombre de panélistes		11			11			11			11		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		9			7			9			5		
Niveau de signification du test 2/5		P<0,05			P<0,05			P<0,05			P<0,05		
		A	E	NdS	B	E	NdS	C	E	NdS	D	E	NdS
Couleur	la plus claire:	9	0	1%	6	1		5	4		3	1	
	la plus appréciée:	9	0	1%	6	1		7	2		4	1	
Odeur	la plus forte:	1	8	5%	2	5		3	4		4	0	
	la plus appréciée:	5	4		2	5		6	3		4	1	
Goût	le plus fort:	6	3		6	1		4	5		2	2	
	le plus apprécié:	9	0	1%	7	0	5%	7	2		4	1	
Acidité	la plus forte:	2	0		1	0		0	0		1	0	
	la plus appréciée:	3	0		1	0		1	0		1	0	
Consistance	la plus élastiques:	9	0	1%	6	1		5	4		3	1	
	+ appréciée (main)	7	2		5	2		6	3		1	4	
	+ appréciée (bouche)	8	1	5%	7	0	5%	7	2		3	2	
Impression générale		9	0	1%	7	0	5%	7	2		4	1	

NdS: Niveau de signification.

INFLUENCE DU MODE DE ROUISSAGE

(DANS L'EAU, NON EPLUCHE / EN SAC, APRES RAPAGE DES RACINES)

SUR LES CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES DU FOUFOU.

TABLEAU 5

		Racines non ensemençées									Racines ensemençées								
		Comparaison: A: non épl. B: épluch.			Comparaison: A: non épl. C: coupées			Comparaison: B: épluch. C: coupées			Comparaison: D: non épl. E: épluch.			Comparaison: D: non épl. F: coupées			Comparaison: E: épluch. F: coupées		
Nombre de panélistes		11			11			11			11			11			11		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		10			10			2			11			11			4		
Niveau de signification du test 2/5		P<0,05			P<0,05			n.s.			P<0,05			P<0,05			P<0,05		
		A	B	NdS	A	C	NdS	B	C	NdS	D	E	NdS	D	F	NdS	E	F	NdS
Couleur	la plus claire:	0	10	1Z	0	10	1Z	1	0		0	11	1Z	0	11	1Z	4	0	
	la plus appréciée:	0	10	1Z	0	10	1Z	1	0		0	11	1Z	0	11	1Z	3	1	
Odeur	la plus forte:	10	0	1Z	9	1	5Z	0	1		10	1	5Z	11	0	1Z	1	0	
	la plus appréciée:	7	3		6	4		1	0		6	5		7	4		3	0	
Goût	le plus fort:	4	6		3	7		1	1		2	9		4	7		2	1	
	le plus apprécié:	1	9	5Z	2	8		2	0		0	11	1Z	0	11	1Z	3	1	
Acidité	la plus forte:	2	0		1	2		0	0		4	0		3	1		1	0	
	la plus appréciée:	1	1		2	1		0	0		0	4		1	4		0	1	
Consistance	la plus élastique:	0	9	1Z	0	10	1Z	1	0		0	11	1Z	0	11	1Z	3	0	
	+ appréciée (main)	2	7		2	8		1	0		2	9		2	9		4	0	
	+ appréciée (bouche)	3	7		1	8		2	0		1	10	5Z	1	10	5Z	4	0	
Impression générale		0	10	1Z	1	9	5Z	2	0		0	11	1Z	0	11	1Z	3	1	

NdS: Niveau de signification.

INFLUENCE DE DIFFERENTES MODALITES DE ROUISSAGE EN SAC

(Racines ensemençées ou non; racines non épluchées, épluchées ou découpées en morceaux après épluchage)

SUR LES CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES DU FOUFOU

TABEAU 6

		Racines non épluch.			Racines épluchées			Racines découpées		
		Comparaison: A: non ens. B: ensem.			Comparaison: C: non ens. D: ensem.			Comparaison: E: non ens. F: ensem.		
Nombre de panélistes		11			11			10		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		11			11			6		
Niveau de signification du test 2/5		P<0,05			P<0,05			P<0,05		
		A	B	NdS	C	D	NdS	E	F	NdS
Couleur	la plus claire:	11	0	1%	0	11	1%	5	1	
	la plus appréciée:	11	0	1%	0	11	1%	6	0	5%
Odeur	la plus forte:	2	9		0	9	1%	3	2	
	la plus appréciée:	5	6		3	6		6	0	5%
Goût	le plus fort:	4	6		6	5		3	2	
	le plus apprécié:	9	1	5%	9	2		5	1	
Acidité	la plus forte:	0	2		3	0		0	2	
	la plus appréciée:	2	0		1	2		2	0	
Consistance	la plus élastique:	11	0	1%	10	0	1%	4	0	
	+ appréciée (main)	8	3		8	2		5	1	
	+ appréciée (bouche)	9	2		8	3		5	1	
Impression générale		9	1	5%	9	2		5	1	

NdS: Niveau de signification.

INFLUENCE DE L'ENSEMENCEMENT PREALABLE DES SACS
SUR LES CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES DE FOUFOUS
ELABORES A PARTIR DE RACINES ROUIES EN SAC

		Rouissage dans l'eau						Rouissage en sac		
		en étang			en bac					
		Comparaison: A: non épl. B: épluch.			Comparaison: C: non épl. D: épluch.			Comparaison: E: non épl. F: épl. à mi-rouissage		
Nombre de panélistes		10			10			10		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		10			7			8		
Niveau de signification du test 2/5		P<0,05			P<0,05			P<0,05		
		A	B	NdS	C	D	NdS	E	F	NdS
Couleur	la plus claire:	0	10	1%	0	7	5%	3	4	
	la plus appréciée:	0	10	1%	2	5		6	1	
Odeur	la plus forte:	3	3		3	3		4	4	
	la plus appréciée:	1	6		0	6	5%	2	4	
Goût	le plus fort:	3	7		2	4		3	3	
	le plus apprécié:	0	10	1%	3	3		5	2	
Acidité	la plus forte:	1	4		0	0		3	0	
	la plus appréciée:	0	6	5%	0	0		2	1	
Consistance	la plus élastique:	1	9	5%	0	6	5%	1	6	
	+ appréciée (main)	2	8		3	4		3	4	
	+ appréciée (bouche)	1	9	5%	4	3		5	2	
Impression générale		0	10	1%	3	4		5	2	

NdS: Niveau de signification.

INFLUENCE DE L'ORDRE DE REALISATION DE L'EPLUCHAGE ET DU ROUISSAGE
SUR LES CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES DU FOUFOU.

TABEAU 8

		Comparaison: A: Rivière B: Etang			Comparaison: A: Rivière C: Bac			Comparaison: A: Rivière D: Fût			Comparaison: B: Etang C: Bac			Comparaison: B: Etang D: Fût			Comparaison: C: Bac D: Fût		
Nombre de panélistes		10			10			10			10			10			10		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		7			7			6			4			2			5		
Niveau de signification du test 2/5		P<0,05			P<0,05			P<0,05			P<0,05			N.S.			P<0,05		
		A	B	NdS	A	C	NdS	A	D	NdS	B	C	NdS	B	D	NdS	C	D	NdS
Couleur	la plus claire:	3	3		3	4		4	1		2	2		2	0		1	4	
	la plus appréciée:	3	3		3	3		5	0		3	1		1	1		3	1	
Odeur	la plus forte:	4	3		3	3		0	4		1	3		0	2		1	2	
	la plus appréciée:	2	3		1	4		2	3		0	4		0	2		3	1	
Goût	le plus fort:	3	4		3	3		2	4		3	1		0	2		1	4	
	le plus apprécié:	3	4		5	2		3	3		2	2		1	1		3	2	
Acidité	la plus forte:	2	4		2	5		1	3		2	1		2	0		5	0	
	la plus appréciée:	5	1		2	5		1	4		1	3		2	0		4	0	
Consistance	la plus élastique:	0	6	5%	0	5		3	2		4	0		1	1		1	4	
	+ appréciée (main)	4	3		3	4		2	4		2	2		2	0		3	1	
	+ appréciée (bouche)	4	3		3	3		2	4		1	3		1	1		2	3	
Impression générale		3	3		4	3		3	3		2	2		1	1		2	2	

NdS: Niveau de signification.

INFLUENCE DU LIEU DE ROUISSAGE (RIVIERE/ETANG/BAC EN CIMENT/FUT EN FER)

SUR LES CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES DE LA CHICOUANGUE

TABLEAU 9

		Comparaison: A: Témoin B: sac (NE)			Comparaison: A: Témoin C: sac (EP)			Comparaison: A: Témoin D: sac (MO)			Comparaison: B: sac (NE) C: sac (EP)			Comparaison: B: sac (NE) D: sac (MO)			Comparaison: C: sac (EP) D: sac (MO)		
Nombre de panélistes		11			11			11			11			11			11		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		11			9			9			9			11			11		
Niveau de signification du test 2/5		P<0,05			P<0,05			P<0,05			P<0,05			P<0,05			P<0,05		
		A	B	NdS	A	C	NdS	A	D	NdS	B	C	NdS	B	D	NdS	C	D	NdS
Couleur	la plus claire:	11	0	1%	9	0	1%	2	7		0	9	1%	0	11	1%	1	10	5%
	la plus appréciée:	11	0	1%	9	0	1%	2	7		0	9	1%	0	11	1%	0	11	1%
Odeur	la plus forte:	1	10	5%	0	9	1%	0	9	1%	2	6		6	5		8	3	
	la plus appréciée:	6	5		5	4		5	4		2	6		4	4		7	4	
Goût	le plus fort:	7	4		4	5		5	4		3	5		5	5		5	5	
	le plus apprécié:	9	2		9	0	1%	7	2		7	1		3	7		0	11	1%
Acidité	la plus forte:	3	8		3	6		6	0	5%	8	0	1%	8	0	1%	5	3	
	la plus appréciée:	6	5		3	0		4	2		8	0	1%	5	3		2	4	
Consistance	la plus élastique:	7	2		9	0	1%	7	1		6	3		7	4		6	5	
	+ appréciée (main)	6	5		8	1	5%	6	2		8	1	5%	4	7		0	11	1%
	+ appréciée (bouche)	8	3		8	1	5%	5	4		4	3		2	8		1	10	5%
Impression générale		10	1	5%	9	0	1%	6	3		5	2		3	7		0	11	1%

NdS: Niveau de signification.

NE: mis en sac non épluché

EP: mis en sac épluché

MO: mis en sac épluché et découpé en morceaux

INFLUENCE DES MODALITES DE ROUISSAGE EN SAC SUR LES

CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES DE LA CHICOUANGUE

(SACS NON ENSEMENCES)

TABLEAU 10

		Comparaison: A: Témoin B: sac (NE)			Comparaison: A: Témoin C: sac (EP)			Comparaison: A: Témoin D: sac (MO)			Comparaison: B: sac (NE) C: sac (EP)			Comparaison: B: sac (NE) D: sac (MO)			Comparaison: C: sac (EP) D: sac (MO)		
Nombre de panélistes		11			11			11			11			11			11		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		9			9			8			9			7			5		
Niveau de signification du test 2/5		P<0,05			P<0,05			P<0,05			P<0,05			P<0,05			P<0,05		
		A	B	NdS	A	C	NdS	A	D	NdS	B	C	NdS	B	D	NdS	C	D	NdS
Couleur	la plus claire:	9	0	1%	7	2		3	4		1	8	5%	0	7	5%	1	3	
	la plus appréciée:	9	0	1%	7	2		5	2		0	9	1%	0	7	5%	2	2	
Odeur	la plus forte:	4	4		3	6		4	4		6	2		1	3		2	3	
	la plus appréciée:	7	1		7	2		4	4		3	5		5	1		4	1	
Goût	le plus fort:	3	6		4	5		5	3		3	4		2	3		1	3	
	le plus apprécié:	6	3		5	4		5	3		5	4		4	2		2	2	
Acidité	la plus forte:	6	2		6	2		6	2		3	4		1	3		1	3	
	la plus appréciée:	6	2		8	0	1%	6	1		3	5		6	0	5%	2	1	
Consistance	la plus élastique:	8	0	1%	8	1	5%	6	2		2	5		0	4		4	0	
	+ appréciée (main)	7	2		6	3		4	3		3	5		3	3		3	1	
	+ appréciée (bouche)	5	4		4	5		4	4		3	6		5	1		2	2	
Impression générale		5	3		6	3		5	3		2	6		4	2		2	2	

NdS: Niveau de signification.

NE: mis en sac non épluché

EP: mis en sac épluché

MO: mis en sac épluché et découpé en morceaux

INFLUENCE DES MODALITES DE ROUISSAGE EN SAC SUR LES

CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES DE LA CHICOUANGUE

(SACS ENSEMENCES AVEC LE JUS D'UN ROUISSAGE PRECEDENT)

		Comparaison: A: Etang NE B: Etang EP			Comparaison: A: Etang NE C: Bac NE			Comparaison: A: Etang NE D: Bac EP			Comparaison: B: Etang EP C: Bac NE			Comparaison: B: Etang EP D: Bac EP			Comparaison: C: Bac NE D: Bac EP		
Nombre de panélistes		10			10			10			10			10			10		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		8			2			5			8			10			3		
Niveau de signification du test 2/5		P<0,05			N.S.			P<0,05			P<0,05			P<0,05			N.S.		
		A	B	NdS	A	C	NdS	A	D	NdS	B	C	NdS	B	D	NdS	C	D	NdS
Couleur	la plus claire:	8	0	1%	0	2		0	5		0	8	1%	0	10	1%	0	3	
	la plus appréciée:	7	1		1	1		0	5		0	8	1%	0	10	1%	0	3	
Odeur	la plus forte:	6	2		1	1		4	1		4	4		4	6		1	2	
	la plus appréciée:	4	4		1	1		2	3		3	5		5	5		0	3	
Goût	le plus fort:	5	3		0	2		2	3		4	4		5	5		2	1	
	le plus apprécié:	1	7		0	2		1	4		4	4		6	4		2	1	
Acidité	la plus forte:	1	5		1	1		4	1		5	0		7	1		3	0	
	la plus appréciée:	1	5		1	1		3	2		4	2		4	4		2	1	
Consistance	la plus élastique:	1	7		1	1		2	3		5	3		6	4		1	2	
	+ appréciée (main)	2	5		0	2		1	3		5	3		9	1	5%	0	3	
	+ appréciée (bouche)	2	6		0	2		0	5		2	5		4	5		1	2	
Impression générale		1	7		0	2		1	4		4	4		6	4		2	1	

NdS: Niveau de signification.

NE: roui non épluché

EP: roui après épluchage

INFLUENCE DU LIEU DE ROUISSAGE (ETANG / BAC EN CIMENT)

ET DE L'EPLUCHAGE PREALABLE DES RACINES SUR LES

CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES DE LA CHICOUANQUE

TABLEAU 12

Lorsque les racines étaient rouies non épluchées, celles préalablement ensemencées ont été moins appréciées que celles ensemencées (tab 7); en revanche, l'effet de l'ensemencement a été inverse pour les racines rouies épluchées.

L'effet favorable de l'épluchage préalable des racines sur la couleur des fofous a été confirmé au cours de l'essai 1C pour des racines rouies en étang et en bac (tab 8).

Aucune influence du lieu de rouissage humide sur les caractéristiques organoleptiques des chikwanges n'a été mise en évidence au cours d'essai 1A (tab 9).

Les chikwanges élaborées à partir de racines rouies en sac ont été en général significativement moins appréciées que les chikwanges témoins provenant de racines rouies dans l'eau (tab 10 et 11); toutefois avec des racines préalablement épluchées ou découpées et ensemencées, il est possible d'obtenir des chikwanges qui ne sont pas jugées significativement inférieures aux témoins (tab 11).

Peu de différences ont été soulignées par les panélistes entre des chikwanges provenant de racines rouies en sac selon que les racines étaient entières, épluchées ou découpées en morceaux.

De même, au cours de l'essai 1C, l'épluchage préalable des racines n'a pas eu d'effet déterminant sur les caractéristiques organoleptiques des chikwanges élaborées à partir de racines rouies en étang et en bac (tab 12).

En définitive, il semble que les caractéristiques organoleptiques des fofous, en particulier leur couleur, soient plus fortement dépendantes des modalités de rouissage que celles des chikwanges.

Toutefois, dans la plupart des cas, avec la variété Pembé, les racines rouies après épluchage ont tendance à donner des chikwanges et des farines plus claires et souvent plus appréciées que celles élaborées à partir de racines rouies non épluchées.

Dans certaines conditions, des chikwanges élaborées à partir de racines rouies en sac après épluchage peuvent avoir une acceptabilité comparable à celle de chikwanges préparées à partir de racines rouies dans l'eau.

3. DEUXIEME SERIE D'ESSAIS: INFLUENCE DE LA VARIETE ET DE L'EPLUCHAGE PREALABLE DES RACINES.

3.1. Essai 2A: 4 variétés.

Au cours de ce premier essai, ont été comparées les variétés Pembe, Ngansa, Mbouaki et Louando; il a permis de mettre en évidence:

- des différences importantes concernant les durées d'épluchage en fonction de la variété et selon que les racines sont épluchées avant ou après rouissage (tab 13).

Tab 13: Influence de la variété et des modalités d'épluchage sur la durée de l'épluchage.

Temps de travail (en seconde/Kg)	PEMBE	NGANSA	MBOUAKI	LOUANDO
Epluchage avant	113	225	180	165
Epluchage après	42	46	44	44

- des bilans massiques de transformation en foufou généralement plus favorables lorsque les racines sont épluchées après rouissage (tab 14).

Tab 14: Influence de la variété et des modalités d'épluchage sur les bilans massiques de transformation en farine et en chikwangue.

Rendement brut: kg de produit/100kg racines	PEMBE	NGANSA	MBOUAKI	LOUANDO
TRANSFORMATION EN FARINE A FOUFOU				
Epluchage avant	29.4	24.2	28.8	25.2
Epluchage après	36.9	32.6	30.5	30.2
TRANSFORMATION EN CHIKWANGUE				
Epluchage avant	52.2	51.8	52.8	60.7
Epluchage après	53.5	55.3	52.4	53.1

- que, concernant les caractéristiques organoleptiques, l'aptitude aux transformations des différentes variétés dépend à la fois du type de transformation et des modalités d'épluchage: pour la transformation en farine, aucun résultat ne ressort nettement (tab 15 et 16); en revanche, pour la transformation en chikwangue, la variété Mbouaki est la variété la plus appréciée lorsque l'épluchage a lieu après rouissage et Louando semble être celle qui donne la meilleure chikwangue lorsque les racines sont préalablement épluchées (tab 17 et 18).

Un effet favorable de l'épluchage préalable des racines n'a pu être mis en évidence de manière significative que pour la transformation de la variété Mbouaki en farine (tab 19 et 20).

3.2. Essai 2B: 8 variétés.

3.2.1. Durée de l'épluchage et bilans massiques des transformations (Tab 21).

Pour les 8 variétés étudiées, la durée moyenne de l'épluchage est en général plus courte (150 seconde/kg contre 194) lorsqu'il est effectué après rouissage; toutefois, si l'écart est très important pour certaines variétés (Moudouma, Zanaga 2 et Dikonda), il est très faible pour d'autres (Pembé, F100, 42M8, TMS30507). Les racines de Ngansa sont celles qui s'épluchent le plus difficilement, même lorsque le rouissage précède l'épluchage; à noter que la durée d'épluchage des racines rouies de Ngansa est nettement plus élevée que celle mesurée dans l'essai précédent ce qui laisse supposer que d'autres facteurs sont susceptibles d'influencer fortement la durée de l'épluchage (âge à la récolte, calibre des racines, stade de ramollissement...).

Bien que les racines utilisées pour la préparation de la chikwangue aient subi un rouissage plus poussé que celles utilisées pour la préparation de farine, il n'existe pas de différence entre les valeurs moyennes obtenues pour les deux types de transformation pour le rendement brut de l'épluchage/rouissage (68,0 contre 69,5) et l'on obtient même, au niveau du rendement réel, une moyenne supérieure pour la transformation menant à la chikwangue (87,6 contre 81,4).

De même, les différences entre les valeurs moyennes obtenues pour les racines épluchées/rouies et les racines rouies/épluchées sont très faibles (70,6 et 67,0 pour les rendements bruts; 84,5 et 85,5 pour les rendements réels).

TABEAU 15 Influence de la variété en fonction des modalités d'épluchage sur les caractéristiques organoleptiques du fofou.

Variétés | PM: Pembe
 NG: Ngansa
 LO: Louenda
 MB: Mbouaki

Modalités d'épluchage | er: épluchage avant rouissage
 re: épluchage après rouissage

		RACINES EPLUCHEES APRES ROUISSAGE									RACINES EPLUCHEES AVANT ROUISSAGE								
		Comparaison: A: PM/re B: NG/re			Comparaison: C: PM/re D: LO/re			Comparaison: E: PM/re F: MB/re			Comparaison: G: PM/er H: NG/er			Comparaison: I: PM/er J: LO/er			Comparaison: K: PM/er L: MB/er		
Nombre de panélistes		9			9			9			9			9			9		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		5			9			7			8			8			9		
Niveau de signification du test 2/5		5%			5%			5%			5%			5%			5%		
		A	B	NdS	C	D	NdS	E	F	NdS	G	H	NdS	I	J	NdS	K	L	NdS
Couleur	la plus claire:	5	0		7	2		4	3		0	8	1%	1	7		0	9	1%
	la plus appréciée:	5	0		7	2		4	3		0	8	1%	1	7		6	3	
Odeur	la plus forte:	2	3		5	3		3	3		7	1		2	4		4	4	
	la plus appréciée:	2	3		6	2		0	1		4	3		2	5		4	3	
Acidité	la plus forte:	0	1		2	2		0	1		3	0		2	2		1	2	
	la plus appréciée:	0	1		3	2		0	1		2	1		2	3		1	2	
Consistance	la plus élastique:	1	2		3	5		1	2		2	3		1	5		3	3	
	la plus collante:	1	0		3	1		0	0		1	3		3	1		2	2	
	+ appréciée (main)	1	2		1	5		4	3		3	3		3	4		5	4	
	+ appréciée (bouche)	2	3		2	7		3	4		2	6		3	5		5	4	
Impression générale (Préférence)		3	2		4	4		3	4		2	6		2	6		5	4	

TABEAU 16 Influence de la variété en fonction des modalités d'épluchage sur les caractéristiques organoleptiques du fofou (suite).

Variétés: NG: Ngansa
 LO: Louenda
 MB: Mbouaki

Modalités d'épluchage: er: épluchage avant rouissage
 re: épluchage après rouissage

		RACINES EPLUCHEES APRES ROUISSAGE									RACINES EPLUCHEES AVANT ROUISSAGE								
		Comparaison: A: NG/re B: LO/re			Comparaison: C: NG/re D: MB/re			Comparaison: E: LO/re F: MB/re			Comparaison: G: NG/er H: LO/er			Comparaison: I: NG/er J: MB/er			Comparaison: K: LO/er L: MB/er		
		A	B	NdS	C	D	NdS	E	F	NdS	G	H	NdS	I	J	NdS	K	L	NdS
Nombre de panélistes		9			9			9			9			9			9		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		9			9			9			9			9			7		
Niveau de signification du test 2/5		5%			5%			5%			5%			5%			5%		
Couleur	la plus claire:	1	8	5%	3	6		1	8	5%	8	1	5%	0	9	1%	4	3	
	la plus appréciée:	1	8	5%	3	6		1	8	5%	8	1	5%	0	9	1%	4	3	
Odeur	la plus forte:	6	1		4	5		5	3		1	7		5	2		2	1	
	la plus appréciée:	5	2		5	4		4	2		3	5		6	3		1	1	
Acidité	la plus forte:	2	2		4	5		4	4		0	5		1	1		3	2	
	la plus appréciée:	3	2		0	2		1	1		1	4		3	1		0	1	
Consistance	la plus élastique:	2	6		5	4		2	3		4	2		2	4		1	1	
	la plus collante:	3	1		0	0		3	3		0	2		1	3		0	0	
	+ appréciée (main)	3	4		4	5		4	5		2	4		4	5		2	3	
	+ appréciée (bouche)	2	7		5	4		4	4		6	3		3	4		1	4	
Impression générale (Préférence)		0	9	1%	2	7		0	9	1%	8	1	5%	0	9	1%	3	3	

TABEAU 17 Influence de la variété en fonction des modalités d'épluchage sur les caractéristiques organoleptiques de la chicouangue.

Variétés: PM: Pembe
 NG: Ngansa
 LO: Louenda
 MB: Mbouaki

Modalités d'épluchage: er: épluchage avant rouissage
 re: épluchage après rouissage

		RACINES EPLUCHEES APRES ROUISSAGE									RACINES EPLUCHEES AVANT ROUISSAGE								
		Comparaison: A: PM/re B: NG/re			Comparaison: C: PM/re D: LO/re			Comparaison: E: PM/re F: MB/re			Comparaison: G: PM/er H: NG/er			Comparaison: I: PM/er J: LO/er			Comparaison: K: PM/er L: MB/er		
Nombre de panélistes		9			9			9			9			9			9		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		7			4			8			1			5			4		
Niveau de signification du test 2/5		5%			5%			5%			NS			5%			5%		
		A	B	NdS	C	D	NdS	E	F	NdS	G	H	NdS	I	J	NdS	K	L	NdS
Couleur	la plus claire:	1	6		1	3		0	7	5%	1	0		0	5		2	1	
	la plus appréciée:	1	6		2	2		1	6		1	0		0	5		2	1	
Odeur	la plus forte:	1	3		1	2		4	4		0	1		1	4		2	1	
	la plus appréciée:	1	3		2	1		6	2		1	0		2	3		1	3	
Acidité	la plus forte:	1	1		3	1		3	0		0	1		1	2		1	0	
	la plus appréciée:	2	0		2	2		2	1		1	0		0	3		1	0	
Consistance	la plus élastique:	1	4		3	0		0	7	5%	1	0		3	2		0	3	
	la plus collante:	3	1		0	1		2	1		0	1		2	1		0	0	
	+ appréciée (main)	2	4		2	0		0	5		1	0		2	1		1	2	
	+ appréciée (bouche)	2	5		2	1		0	7	5%	1	0		1	3		2	2	
Impression générale (Préférence)		1	6		3	1		0	7	5%	1	0		1	4		2	2	

TABEAU 18 Influence de la variété en fonction des modalités d'épluchage sur les caractéristiques organoleptiques de la chicouaque (suite).

Variétés: NG: Ngansa
 LO: Louenda
 MB: Mbouaki

Modalités d'épluchage: er: épluchage avant rouissage
 re: épluchage après rouissage

		RACINES EPLUCHEES APRES ROUISSAGE									RACINES EPLUCHEES AVANT ROUISSAGE								
		Comparaison: A: NG/re B: LO/re			Comparaison: C: NG/re D: MB/re			Comparaison: E: LO/re F: MB/re			Comparaison: G: NG/er H: LO/er			Comparaison: I: NG/er J: MB/er			Comparaison: K: LO/er L: MB/er		
Nombre de panélistes		9			9			9			9			9			9		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		9			5			8			5			2			5		
Niveau de signification du test 2/5		5%			5%			5%			5%			NS			5%		
		A	B	NdS	C	D	NdS	E	F	NdS	G	H	NdS	I	J	NdS	K	L	NdS
Couleur	la plus claire:	7	1		2	1		1	7		4	1		0	2		1	4	
	la plus appréciée:	7	1		1	2		0	8	1%	4	1		0	2		1	4	
Odeur	la plus forte:	0	5		0	3		0	8	1%	2	2		1	0		2	3	
	la plus appréciée:	3	5		1	3		6	2		3	1		1	0		1	4	
Acidité	la plus forte:	3	4		2	1		3	0		3	0		1	0		1	3	
	la plus appréciée:	2	0		2	1		2	1		2	1		1	0		2	2	
Consistance	la plus élastique:	2	7		2	3		3	5		2	2		1	1		4	1	
	la plus collante:	2	2		0	0		1	1		0	0		0	0		0	1	
	+ appréciée (main)	3	6		0	2		1	4		2	1		1	0		1	1	
	+ appréciée (bouche)	4	2		1	3		1	7		2	2		1	1		3	2	
Impression générale (Préférence)		6	3		1	4		0	8	1%	3	1		1	1		4	1	

TABLEAU 19 Influence des modalités d'épluchage en fonction de la variété sur les caractéristiques organoleptiques du fofou.

Variétés | PM: Pembe
 NG: Ngansa
 LO: Louenda
 MB: Mbouaki

Modalités d'épluchage | er: épluchage avant rouissage
 re: épluchage après rouissage

		Comparaison: A: PM/re B: PM/er			Comparaison: C: NG/re D: NG/er			Comparaison: E: LO/re F: LO/er			Comparaison: G: MB/re H: MB/er		
		A	B	NdS	C	D	NdS	E	F	NdS	G	H	NdS
Nombre de panélistes		9			9			9			9		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		8			8			9			9		
Niveau de signification du test 2/5		5%			5%			5%			5%		
Couleur	la plus claire:	5	3		0	8	1%	9	0	1%	0	9	1%
	la plus appréciée:	5	3		0	8	1%	9	0	1%	0	9	1%
Odeur	la plus forte:	4	3		5	1		3	4		7	2	
	la plus appréciée:	6	2		4	3		3	4		4	3	
Acidité	la plus forte:	2	3		1	0		6	0	5%	5	2	
	la plus appréciée:	2	1		1	1		5	1		2	2	
Consistance	la plus élastique:	4	2		1	5		2	6		3	2	
	la plus collante:	1	3		2	0		2	2		0	0	
	+ appréciée (main)	4	2		2	3		4	3		3	3	
	+ appréciée (bouche)	5	2		2	6		5	4		5	4	
Impression générale (Préférence)		6	2		2	6		7	2		0	9	1%

TABEAU 20 Influence des modalités d'épluchage en fonction de la variété sur les caractéristiques organoleptiques de la chicouangue.

Variétés | PM: Pembe
 NG: Ngansa
 LO: Louenda
 MB: Mbouaki

Modalités d'épluchage | er: épluchage avant rouissage
 re: épluchage après rouissage

		Comparaison: A: PM/re B: PM/er			Comparaison: C: NG/re D: NG/er			Comparaison: E: LO/re F: LO/er			Comparaison: G: MB/re H: MB/er		
		A	B	NdS	C	D	NdS	E	F	NdS	G	H	NdS
Nombre de panélistes		9			9			9			9		
Nombre de panélistes ayant décelé une différence (test 2/5)		4			7			8			9		
Niveau de signification du test 2/5		5%			5%			5%			5%		
Couleur	la plus claire:	1	3		3	1		4	4		6	2	
	la plus appréciée:	0	4		4	1		3	5		7	1	
Odeur	la plus forte:	3	1		4	4		5	3		5	3	
	la plus appréciée:	2	2		4	4		4	4		4	4	
Acidité	la plus forte:	3	0		4	4		4	1		2	3	
	la plus appréciée:	2	1		2	2		2	2		2	2	
Consistance	la plus élastique:	2	2		6	1		1	6		7	0	5%
	la plus collante:	2	2		2	0		0	0		1	0	
	+ appréciée (main)	3	1		2	2		3	2		4	0	
	+ appréciée (bouche)	0	3		7	1		3	5		6	2	
Impression générale (Préférence)		1	3		6	1		1	7		7	1	

TABLEAU 21: Influence de la variété et de l'épluchage préalable des racines sur la durée de l'épluchage et les bilans massiques sur la base de la matière brute et de la matière sèche comestible au cours de la transformation des racines en foufou et chikwangue.

	PEMBE		MOUDOUMA		NGANSA		ZANAGA 2		DIKONDA		F100		42MB		TMS30507	
	E/R	R/E	E/R	R/E	E/R	R/E	E/R	R/E	E/R	R/E	E/R	R/E	E/R	R/E	E/R	R/E
Durée d'épluchage (seconde/kg)	130	120	256	87	233	298	270	123	203	121	169	146	187	170	106	140
Bilan de l'épluchage / rouissage																
* FOUFOU																
- Rdt brut (1)	71,6	68,8	78,1	68,9	75,9	63,9	76,8	65,9	76,5	66,1	62,2	59,8	63,3	71,7	66,7	
- Rdt réel (2)	76,5	81,3	81,4	76,0	89,7	81,5	75,6	79,2	88,2	87,6	62,1	69,8	84,1	85,4	97,8	
* CHIKWANGUE																
- Rdt brut (1)	70,5	67,3	65,0	71,3	73,1	67,0	67,7	69,7	73,4	68,3	61,7	66,4	67,2	65,6	68,4	64,2
- Rdt réel (2)	87,4	84,1	75,8	84,5	99,9	79,6	79,9	91,6	91,4	78,7	86,0	99,6	87,8	87,7	96,7	90,4
Bilan global																
* FOUFOU																
- Rdt brut (1)	29,7	29,2	31,2	30,2	27,6	26,9	27,9	24,2	28,9	25,0	31,2	20,2	29,1	29,9	28,6	
- Rdt réel (2)	76,3	80,0	79,4	76,0	61,1	78,3	76,5	65,3	82,2	72,4	62,1	67,2	84,1	85,4	97,8	
* CHIKWANGUE																
- Rdt brut (1)	35,0	31,9	42,5	44,4	21,3	28,1	41,7	50,0	31,5	39,5	37,8	43,0	32,5	33,4	28,0	24,0
- Rdt réel (2)	41,8	39,3	49,5	50,6	26,1	35,4	51,6	61,3	39,3	48,9	47,9	58,3	33,1	43,5	34,7	32,5

(1) Kg de produit obtenu pour 100 Kg de racines brutes.

(2) Kg de matière sèche de produit pour 100kg de matière sèche comestible contenue dans les racines brutes.

E/R: Epluchage avant rouissage.

R/E: Epluchage après rouissage.

Si l'on considère le bilan global des transformations, on constate que si, du fait du séchage, la transformation en farine conduit à un rendement brut moyen plus faible que celui de la transformation en chikwangué (27,8 contre 35,3), en revanche, en raison des pertes occasionnées par le défibrage, le rendement réel moyen de la transformation en farine (77,2) est beaucoup plus élevé que celui de la transformation en chikwangué (43,3).

Si l'on compare les valeurs moyennes obtenues pour les bilans globaux selon que les racines ont été épluchées avant ou après rouissage, on n'observe aucune différence au niveau des rendements bruts (30,8 contre 32,2) mais, en revanche, au niveau des rendements réels, on met en évidence un effet favorable de l'épluchage après récolte (75,4 contre 79,1 pour la transformation en farine; 40,5 contre 46,2 pour la transformation en chikwangué).

Quel que soit le type de transformation les rendements réels obtenus pour Ngansa et 42MB sont nettement plus faibles lorsque les racines sont épluchées avant rouissage; au vu des rendements de la transformation, les variétés Moudouma, Zanaga 2 et F100 semblent être les plus intéressantes pour la transformation en chikwangué.

3.2.2. Caractéristiques organoleptiques des produits finis.

Les fofous et chikwangués élaborés à partir des différentes variétés ont été comparés en prenant la variété Pembé comme témoin.

Lorsque les racines sont épluchées après rouissage, Pembé permet l'obtention d'un fofou ayant une couleur plus appréciée que celle des fofous de Moudouma, Ngansa et Zanaga 2, mais l'impression générale laissée par les fofous de Zanaga 2 et de Dikonda est supérieure à celle laissée par le fofou de Pembé. Aucune préférence significative n'a été mise en évidence entre les chikwangués élaborés à partir des différentes variétés.

Lorsque les racines sont épluchées avant rouissage, aucune préférence significative pour l'une des variétés n'a été constatée que ce soit après transformation en fofou ou après transformation en chikwangué.

Tab 22: Influence de l'ordre dans lequel sont effectués le rouissage et l'épluchage sur les préférences exprimées par les panélistes pour différentes variétés.

	FOUFOU		CHIKWANGUE	
	Couleur	Impression générale	Couleur	Impression générale
Pembe	E > R	E > R	E > R	E > R
Moudouma	E > R	=	R > E	R > E
Ngansa	E > R	=	E > R	E > R
Zanaga 2	E > R	E > R	=	=
Dikonda	E > R	=	=	=
F100	nd	nd	=	=
42MB	=	=	R > E	R > E
TMS30507	=	=	=	R > E

E > R: Influence favorable de l'épluchage préalable

R > E: Influence favorable du rouissage préalable.

= : Pas de préférence

La comparaison des fougous et chikwanges obtenues pour chaque variété à partir de racines épluchées/rouies et des racines rouies/épluchées permet d'observer davantage de différences (tab 22):

- quel que soit le type de transformation, il est préférable d'éplucher Pembe et Ngansa préalablement au rouissage;
- l'épluchage préalable a un effet favorable pour la plupart des variétés lors de la préparation du fougou; en revanche, certaines chikwanges ont été davantage appréciées lorsqu'elles provenaient de racines épluchées après rouissage.

3.2.3. Sur la composition chimique des farines (tab 23).

Les farines provenant de racines épluchées avant rouissage sont moins acides et ont une teneur en protéines et en fibres moins élevées que celles élaborées à partir de racines épluchées après rouissage.

On constate des teneurs en fibres plus élevées pour la variété Ngansa, des teneurs en protéines plus élevées pour les variétés Moudouna et Ngansa (1,92 et 1,80 g/100g MS en moyenne) et, inversement des teneurs en protéines plus faibles pour la variété Zanaga 2 (1,26 g/100g MS).

Tab 23: Influence de l'ordre dans lequel sont effectués l'épluchage et le rouissage sur le pH et les teneurs en quelques composants des farines.

	EPLUCHAGE / ROUISSAGE		ROUISSAGE / EPLUCHAGE	
	Moyenne	Extrêmes	Moyenne	Extrêmes
pH	7,98	6,87 - 9,00	6,73	5,78 - 8,05
Acidité totale (mmole/100 g MS)	0,50	0,00 - 1,53	1,91	0,37 - 3,41
Cyanures totaux (ppm)	8,0	6,6 - 10,2	7,5	6,7 - 8,9
Fibres (ADF) g/100gMS	2,10	1,77 - 2,50	2,39	1,89 - 3,89
Protéines (g/100gMS)	1,50	1,24 - 1,97	1,70	1,28 - 1,92
Cendres (g/100g MS)	1,20	1,00 - 1,38	1,23	1,09 - 1,47

3.2.4. Conclusion.

Principalement en raison de leurs répercussions sur la pénibilité de l'épluchage et sur les rendements des transformations, les choix à préconiser concernant les modalités de rouissage semblent dépendre étroitement de la nature des variétés utilisées; un nouvel essai intervariétal à partir de racines âgées de 24 mois est en cours pour confirmer ces premiers résultats.

4. TROISIEME SERIE D'ESSAIS: INFLUENCE DE L'EPLUCHAGE PREALABLE DES RACINES SUR LE DEROULEMENT DU ROUISSAGE, LE RENDEMENT DES TRANSFORMATIONS ET LA QUALITE DES PRODUITS FINIS.

4.1. ROUISSAGE EN FUT.

4.1.1. Déroulement du rouissage.

Bien que les évolutions de la température et de l'oxygène dissous dans l'eau (fig 46 et 47) soient comparables dans les deux fûts, les évolutions du pH de l'eau (fig 48), d'une part, du poids, du pH, et de l'acidité totale des racines (fig 49 à 51), d'autre part, et la décomposition des glucosides cyanogénétiques (fig 52 et 53) sont plus rapides dans le fût contenant les racines préalablement épluchées.

Les évolutions des teneurs en éthanol (fig 54) et en acide lactique (fig 55) dans les racines des deux fûts ne sont pas très différentes; en revanche, l'augmentation de teneurs en acide acétique et en acide butyrique est plus importante dans les racines rouies sans avoir été épluchées (fig 56 et 57).

Les évolutions des populations bactériennes traduisent une croissance plus rapide de la flore totale et de la flore lactique (fig 58) et des flores amylolytiques et pectinolytiques (fig 59) dans les racines rouies après avoir été épluchées.

En définitive, le rouissage semble se dérouler de manière identique dans les deux fûts mais avec un croissance et une activité plus rapide des populations bactériennes dans les racines épluchées avant rouissage.

4.1.2. Rendement des transformations.

L'ordre dans lequel sont réalisés l'épluchage et le rouissage a peu influé dans cet essai, effectué avec la variété Ngansa, sur les rendements des différentes étapes de la préparation de la chikwangu (fig 60 et 61). Par contre, les rendements de la transformation en fougou se sont révélés plus élevés dans le cas des racines rouies non épluchées (32,1 contre 25,1 pour les rendements bruts; 89,6 contre 70,0 pour les rendements réels).

4.1.3. Qualité des produits finis.

La comparaison des caractéristiques organoleptiques des fougous et chikwangu élaborés à partir des racines rouies/épluchées et épluchées rouies a permis de constater que l'épluchage préalable n'influeait significativement que sur la couleur des chikwangu, mais que, en revanche, il avait un effet significativement favorable sur la couleur, l'élasticité et l'impression générale laissée par les fougous.

La farine élaborée à partir de racines épluchées avant rouissage à un pH inférieur (6,97 contre 7,69, une acidité totale supérieure (0,41 contre 0,30 mmole/100gMS) et une teneur résiduelle en cyanures plus faible (2,9 contre 4,5 ppm) que la farine provenant de racines épluchées après rouissage.

4.2. ROUISSAGE EN SAC.

4.2.1. Déroulement du rouissage.

Par comparaison avec l'essai précédent au cours duquel les racines étaient immergées dans l'eau, les résultats obtenus montrent que:

FIGURE 46

TEMPERATURE DE L'EAU DANS LES FUTS EN PLASTIQUE

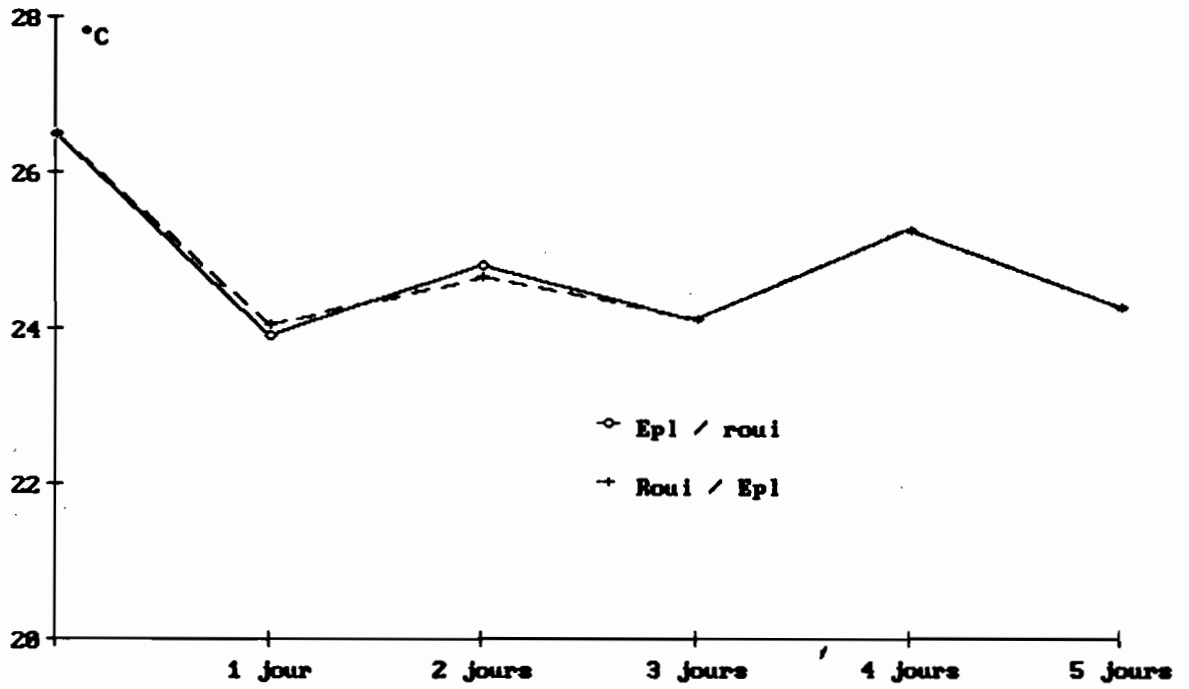


FIGURE 47

OXYGENE DISSOUS DANS L'EAU DES FUTS EN PLASTIQUE

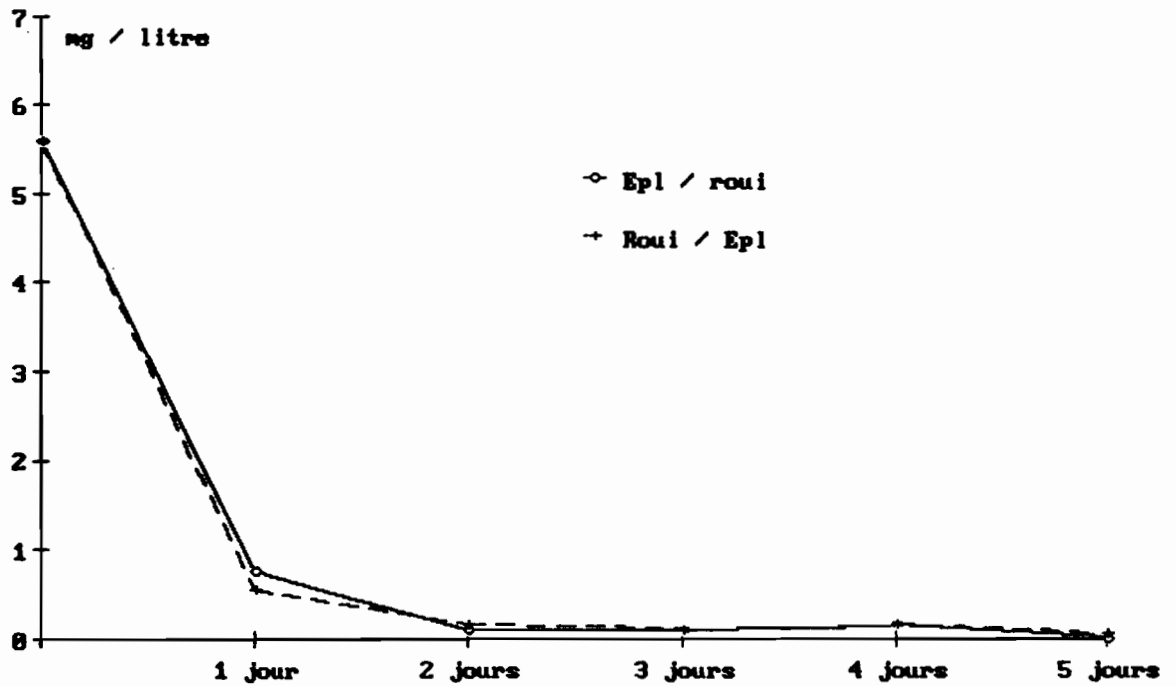


FIGURE 48

pH DE L'EAU DANS LES FUTS EN PLASTIQUE

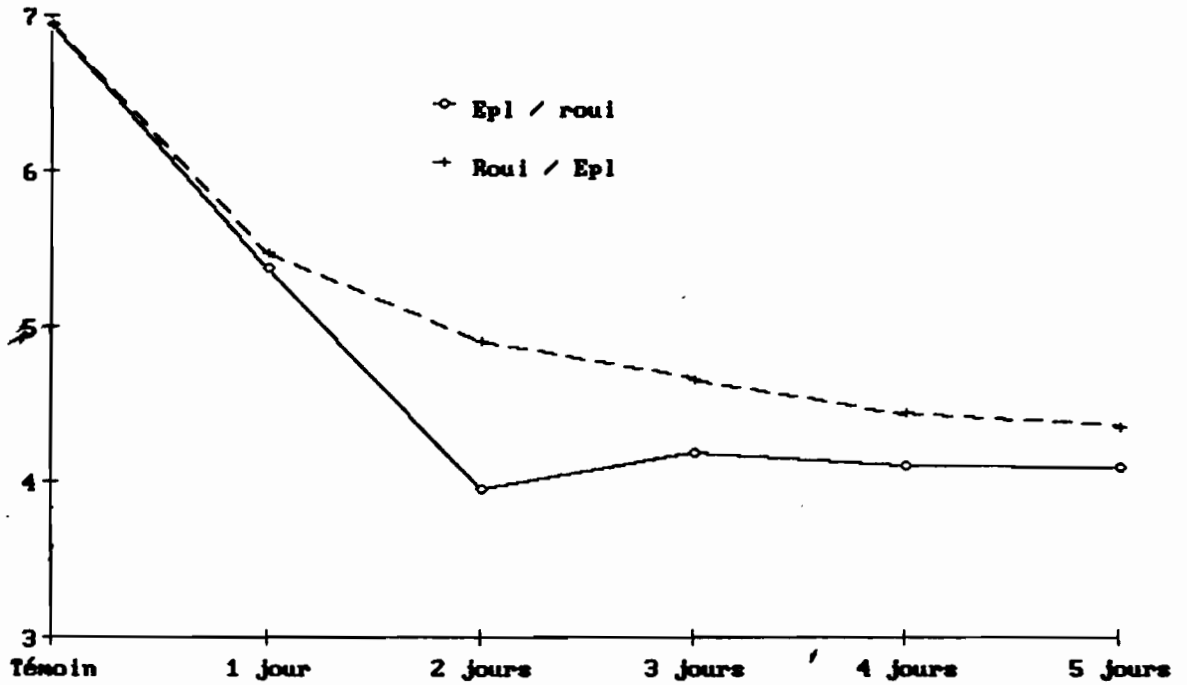


FIGURE 49

EVOLUTION DU POIDS DES RACINES AU COURS DU ROUISSAGE

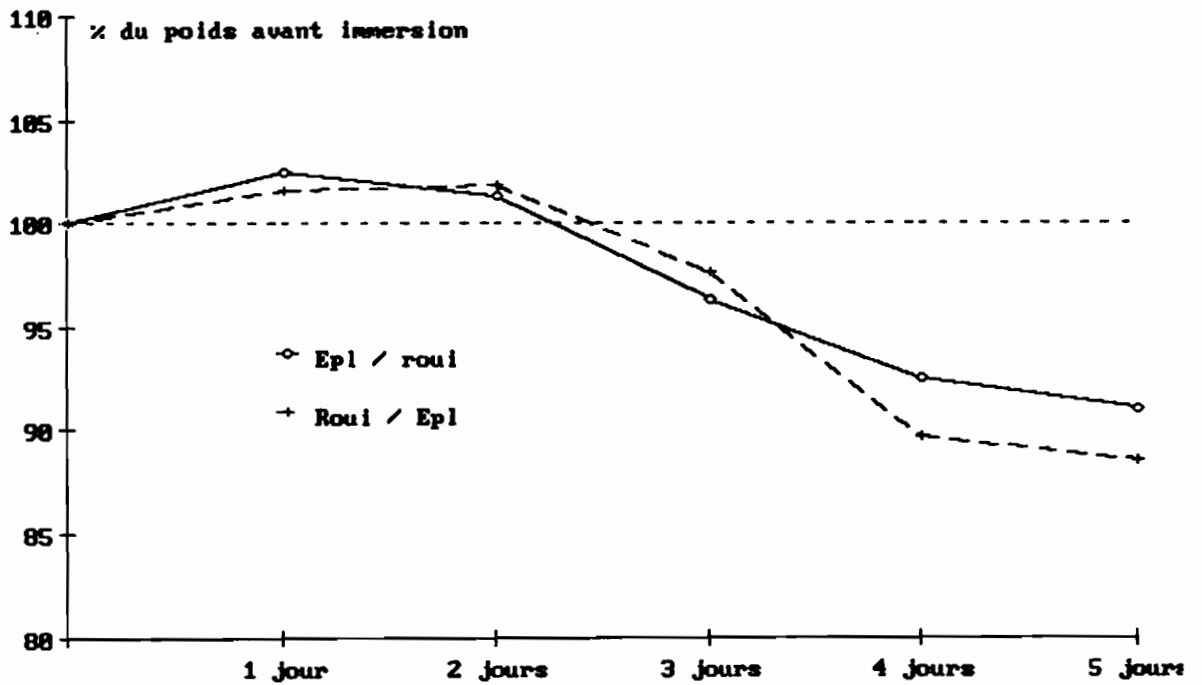


FIGURE 50

pH DES RACINES

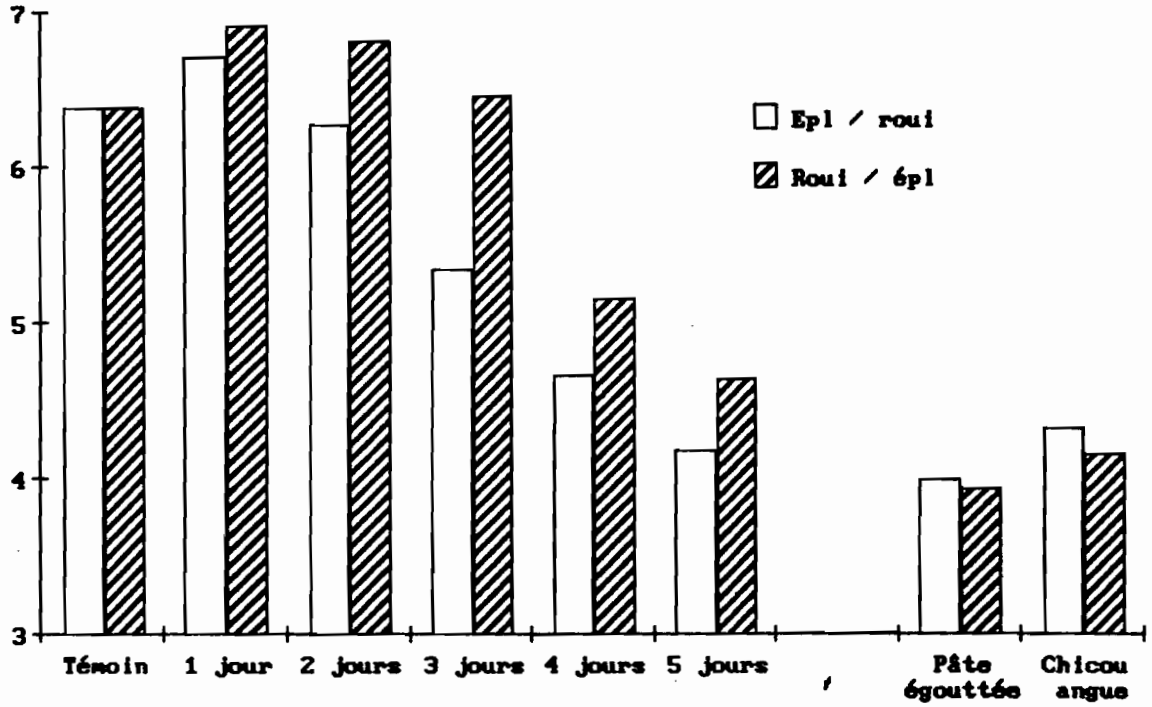


FIGURE 51

TENEUR EN ACIDES TOTAUX DES RACINES

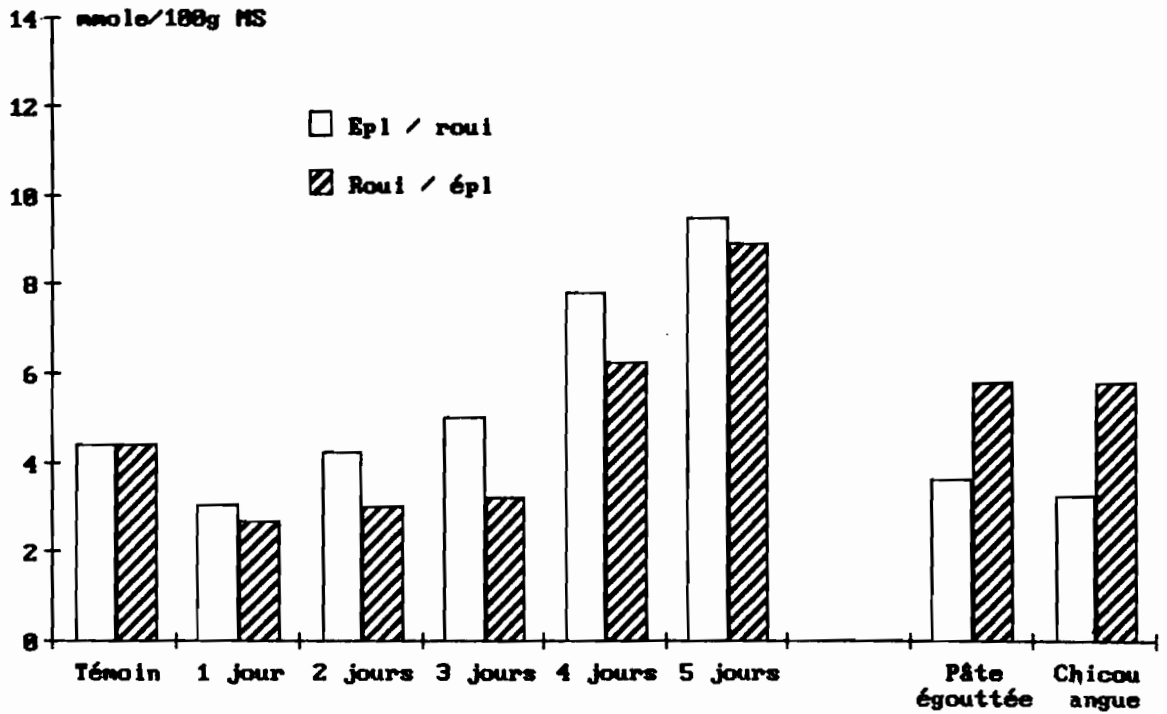


FIGURE 52

TENEUR EN CYANURES DES RACINES
 RACINES NON EPLUCHEES

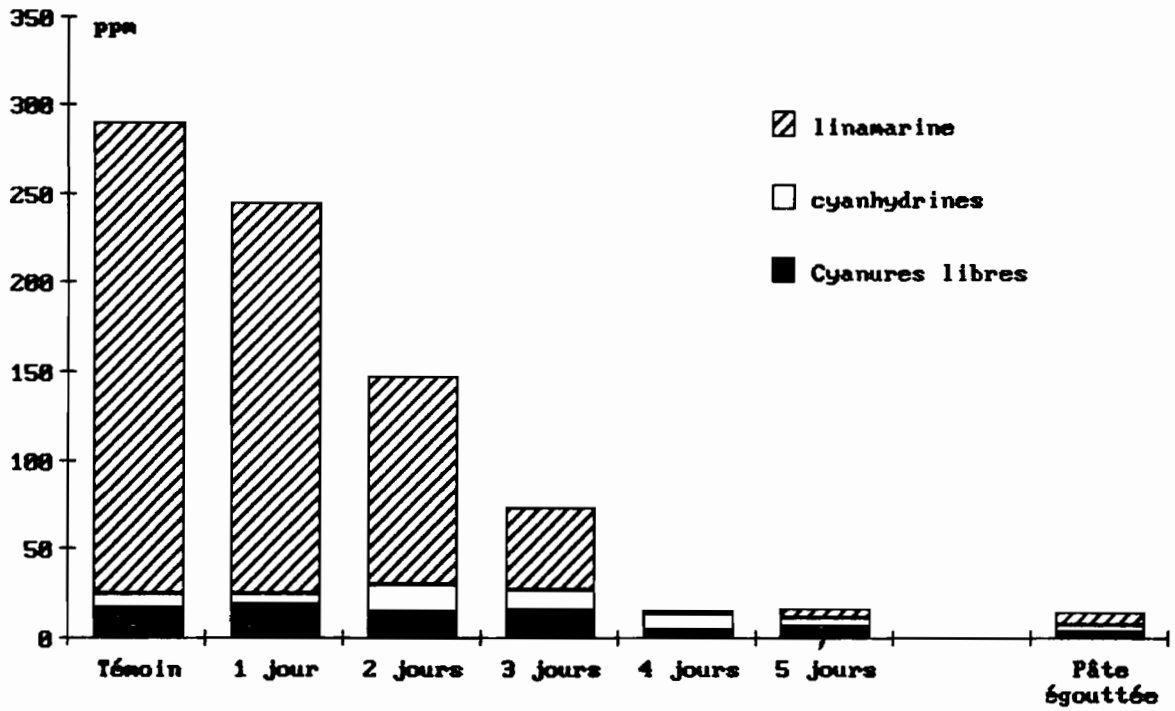


FIGURE 53

TENEUR EN CYANURES DES RACINES
 RACINES APRES EPLUCHAGE

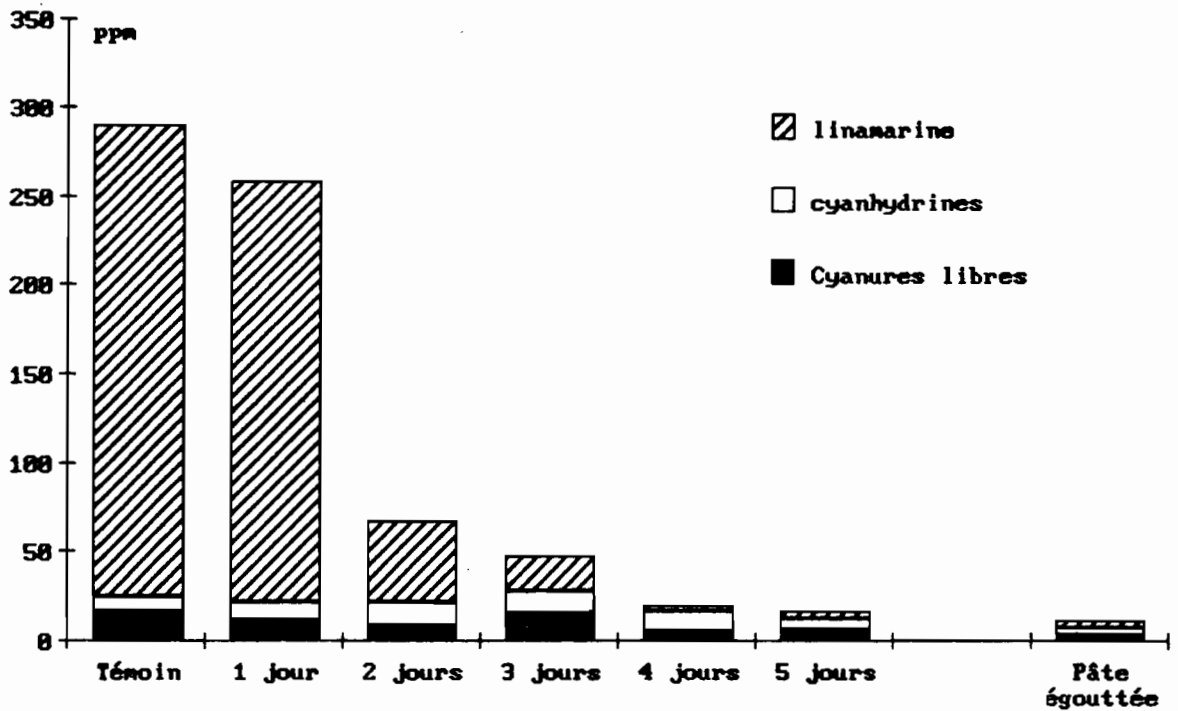


FIGURE 54

ETHANOL

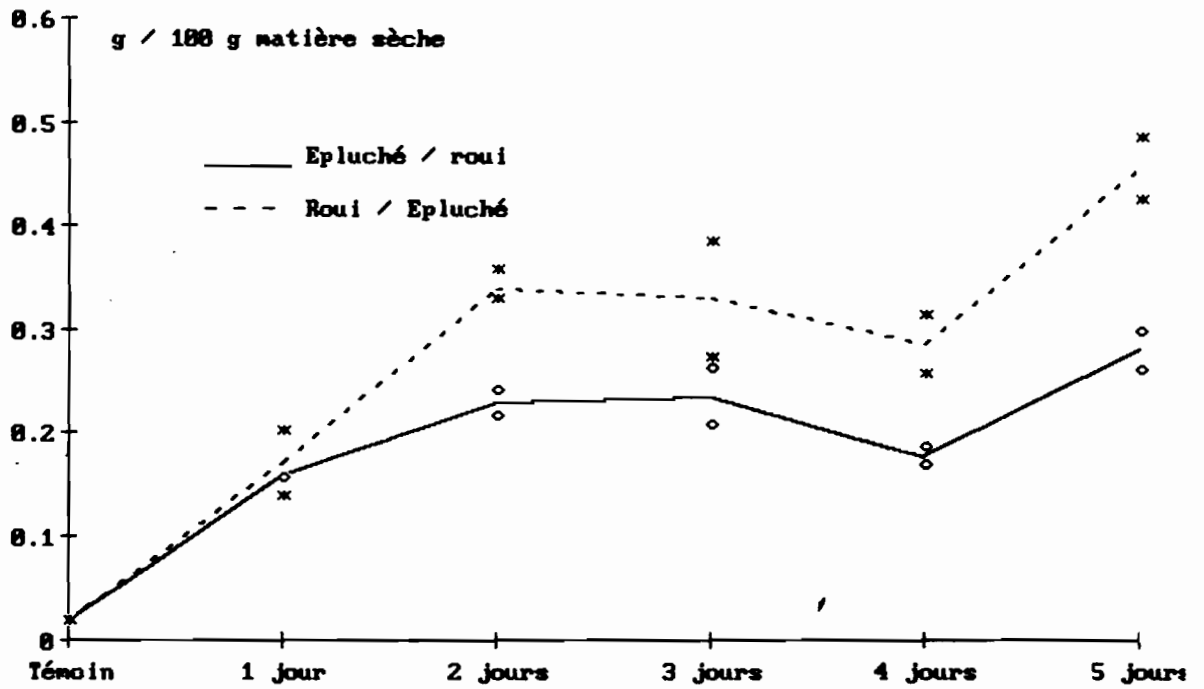


FIGURE 55

ACIDE LACTIQUE (DOSAGE HPLC)

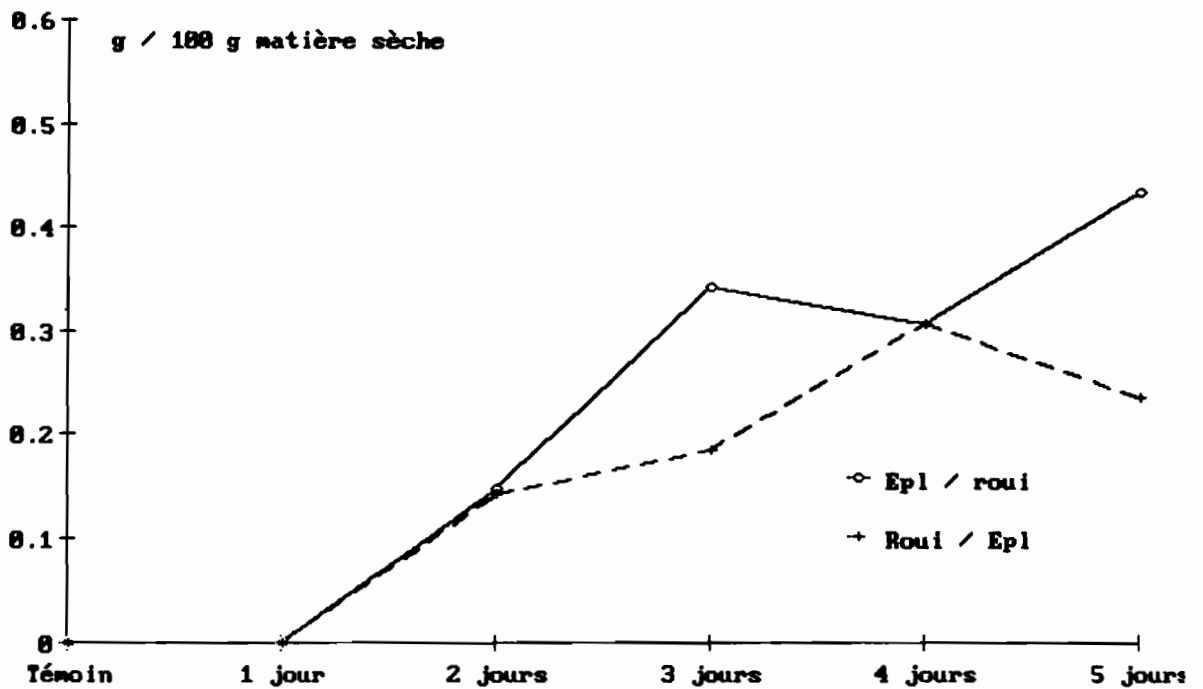


FIGURE 56

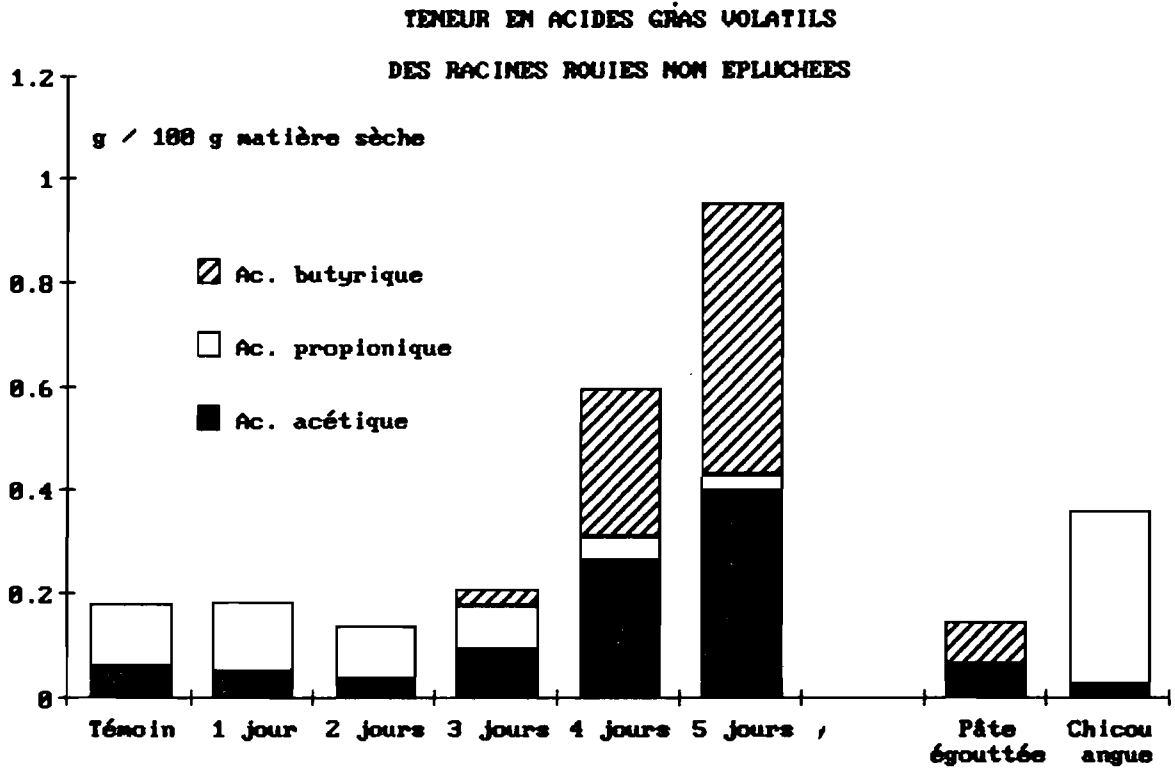


FIGURE 57

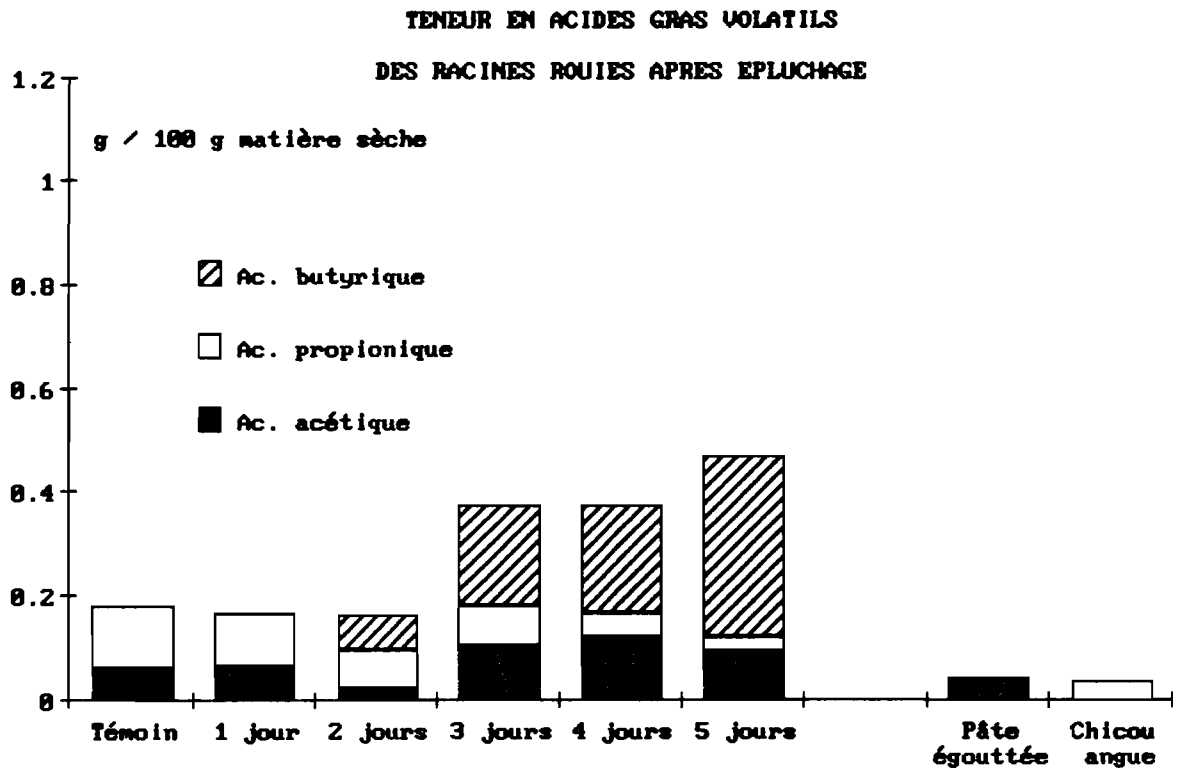


FIGURE 58

EVOLUTION DES POPULATIONS BACTERIENNES

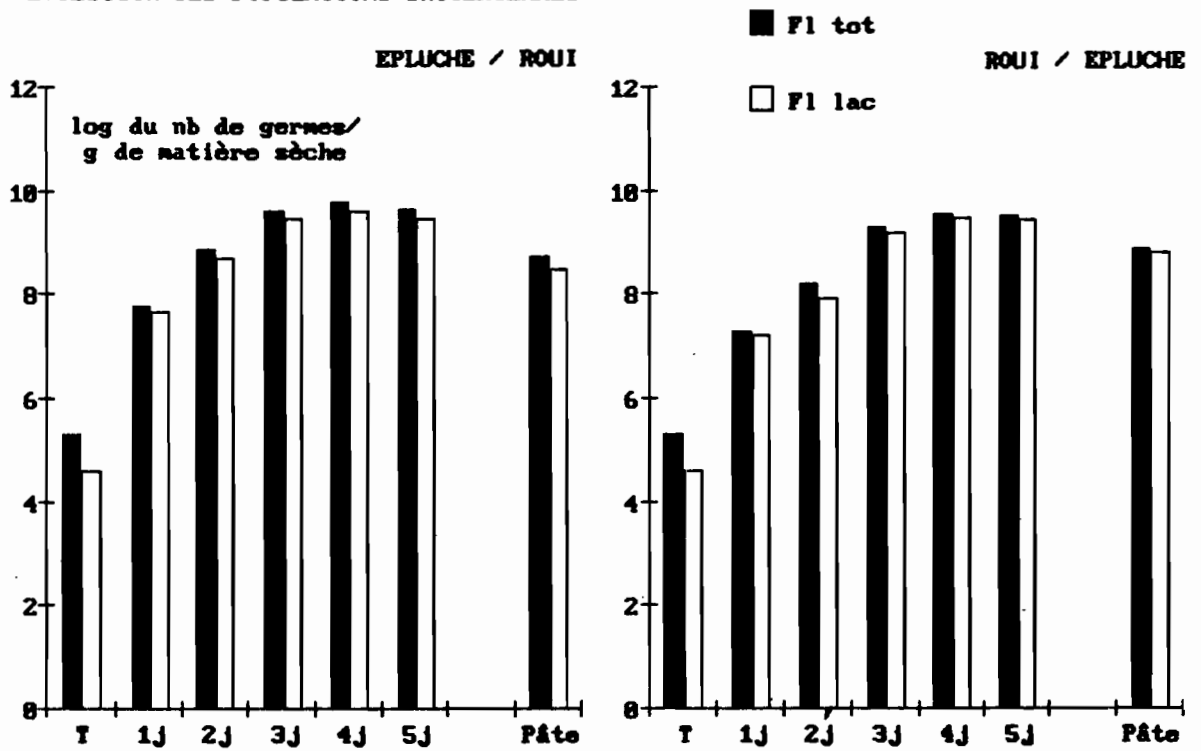


FIGURE 59

EVOLUTION DES POPULATIONS BACTERIENNES

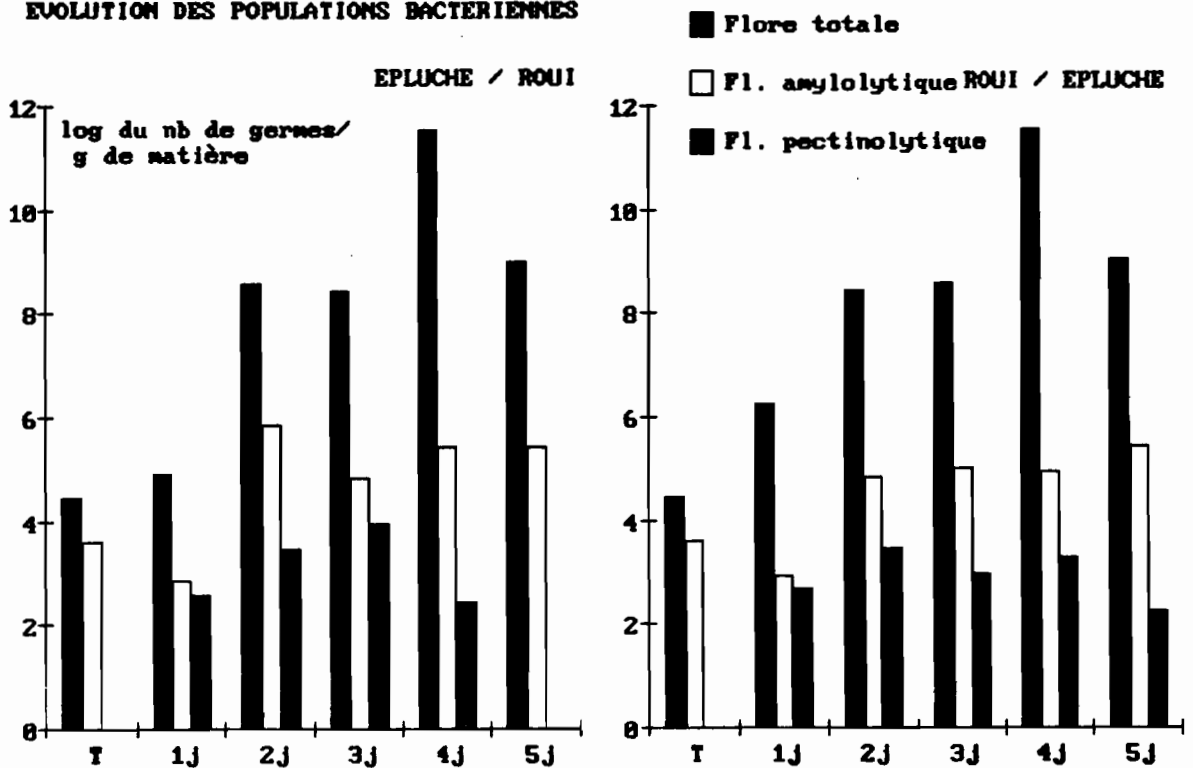


FIGURE 60

COMPARAISON DES RENDEMENTS BRUTS DES DIFFERENTES
ETAPES DE PREPARATION DE LA CHICOUANGUE

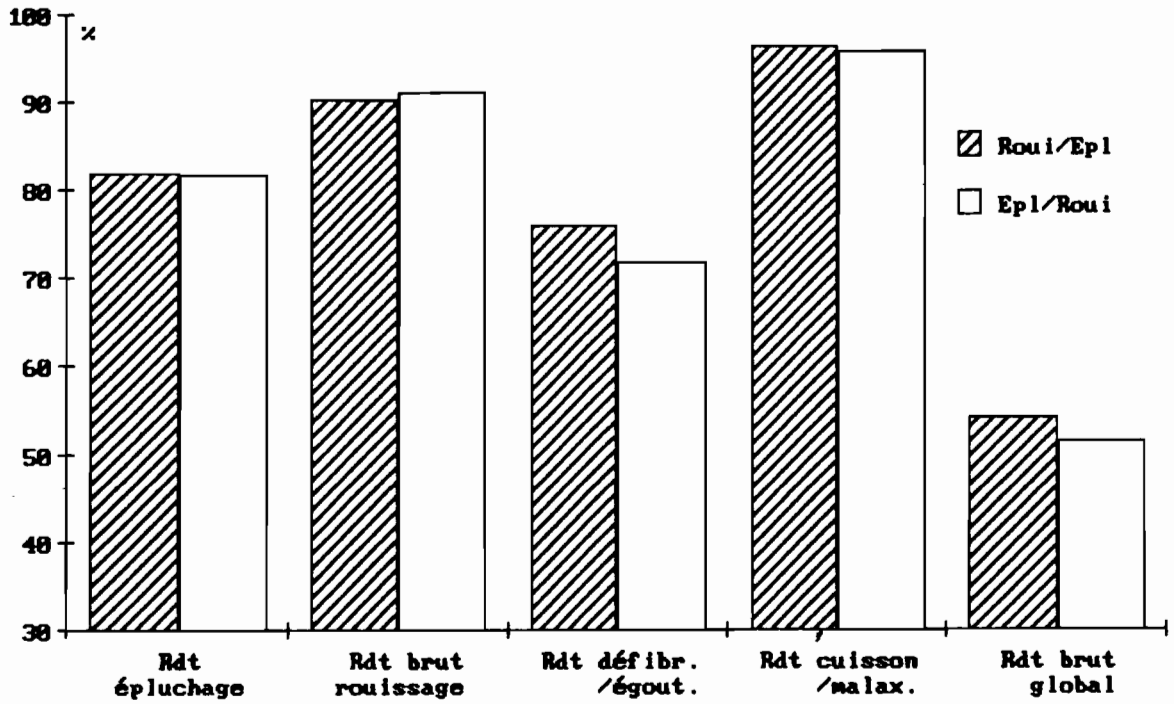
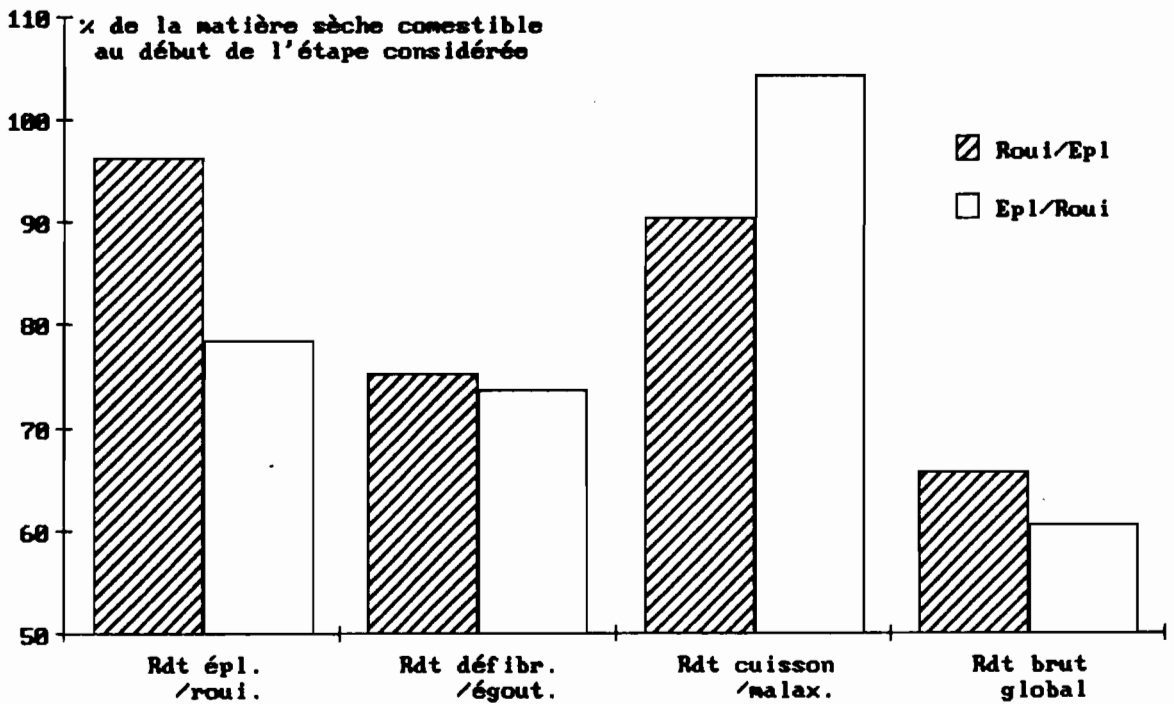


FIGURE 61

COMPARAISON DES RENDEMENTS REELS DES DIFFERENTES
ETAPES DE PREPARATION DE LA CHICOUANGUE



- le temps nécessaire pour ramollir les racines est beaucoup plus long dans le cas d'un rouissage à sec puisque le stade de ramollissement minimal pour préparer du fougou n'a été atteint qu'au bout de 18 jours et que celui nécessaire à la fabrication de la chicouange n'a jamais été atteint (contrairement à ce qui s'était passé au cours de la première série d'essais ou ce stade était apparu après 3 à 4 semaines).
- la teneur en matière sèche des racines augmente légèrement (fig 62) pendant que leur poids diminue (fig 63) ce qui s'explique par une perte d'eau que l'on retrouve au fond des sacs.
- comme dans les fûts, le pH des racines préalablement épluchées diminue plus vite que celui des racines entières (fig 64) tandis que leur acidité totale (fig 65) augmente plus rapidement. A noter que le pH atteint est notablement plus faible et l'acidité totale 4 à 5 fois plus forte que dans le cas de rouissage en fût.
- dans le processus de décomposition des glucosides cyanogénétiques (fig 66 et 67), on constate une accumulation plus importante de cyanhydrines que dans le cas d'un rouissage en fût, probablement en raison d'une diminution plus rapide du pH en dessous de 5,5. Les teneurs résiduelles en cyanures libres après 19 jours restent élevées; il est nécessaire d'étudier leur devenir dans le cas d'une transformation en farine à fougou.
- les teneurs en éthanol (fig 68) et en AGV (fig 69 à 71) (sauf celle en acide propionique), sont de 2 à 6 fois plus élevées que celles observées dans les racines rouies dans l'eau; on constate un retard de l'évolution des teneurs dans les racines rouies entières par rapport à l'évolution observée pour les racines rouies épluchées.
- l'évolution de la flore totale (fig 72) et de la flore lactique (fig 73) est comparable à celle observée dans les racines rouies en fût mais leur importance quantitative est moindre; par contre, les flores amylolytiques et pectinolytiques (fig 74) atteignent un niveau comparable.

En définitive, si le ramollissement et la détoxication des racines rouies à sec sont moins complètes et se produisent dans une échelle de temps 4 à 5 fois plus importante que les racines rouies dans l'eau, la comparaison des deux milieux de rouissage laisse apparaître, si l'on fait abstraction de la différence d'échelles de temps, une évolution assez peu différente des populations bactériennes et une augmentation plus importante de l'acidité totale et des teneurs en AGV.

4.2.2. Rendement des transformations.

L'ordre dans lequel sont réalisés l'épluchage et le rouissage n'a pas influé sur les bilans massiques de la transformation en fougou (33,0 et 33,3 pour les rendements bruts; 93,6 et 92,7 pour les rendements réels).

Ces valeurs sont notablement plus élevées que celles mesurées, avec la même variété, au cours de l'essai en fût.

4.2.3. Qualité des produits finis.

La comparaison des caractéristiques organoleptiques des fougous élaborés à partir des racines rouies/épluchées et épluchées/rouies met en évidence, comme dans l'essai de rouissage en fût, un effet favorable significatif de l'épluchage préalable sur la couleur, l'élasticité et l'impression générale laissée par les fougous.

Pour les fougous préparés à partir de racines épluchées, il a été constaté que ceux provenant de racines rouies en fût (essai 3A) ont été davantage

FIGURE 62
TENEUR EN MATIERE SECHE

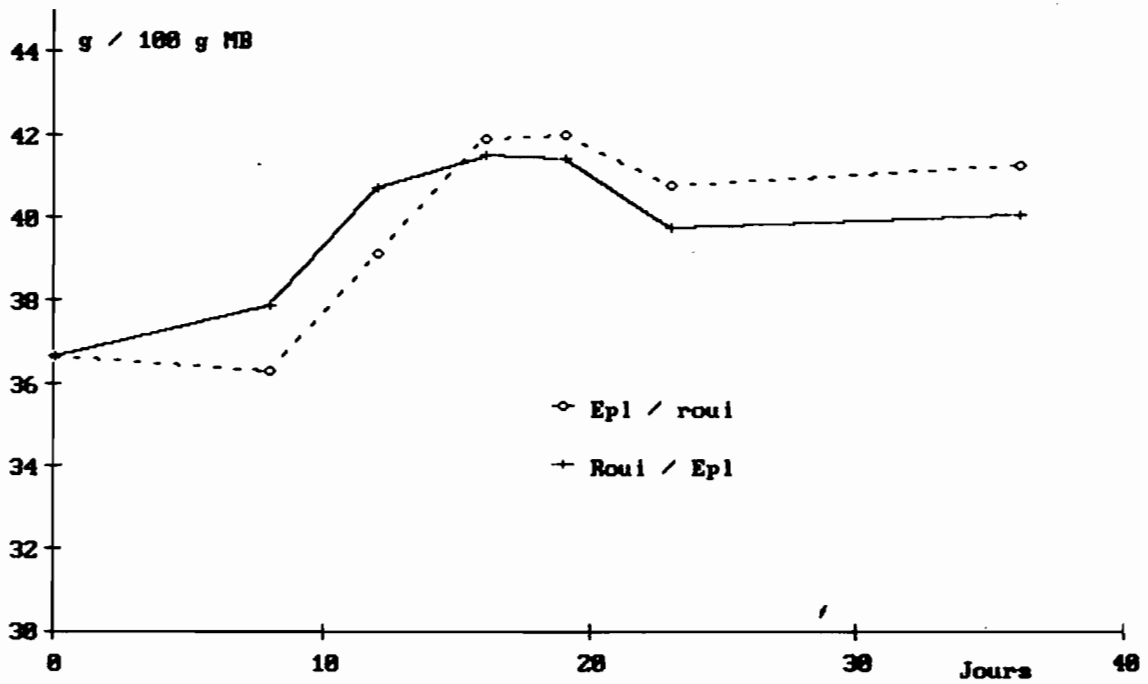


FIGURE 63
EVOLUTION DU POIDS DES RACINES AU COURS DU ROUISSAGE

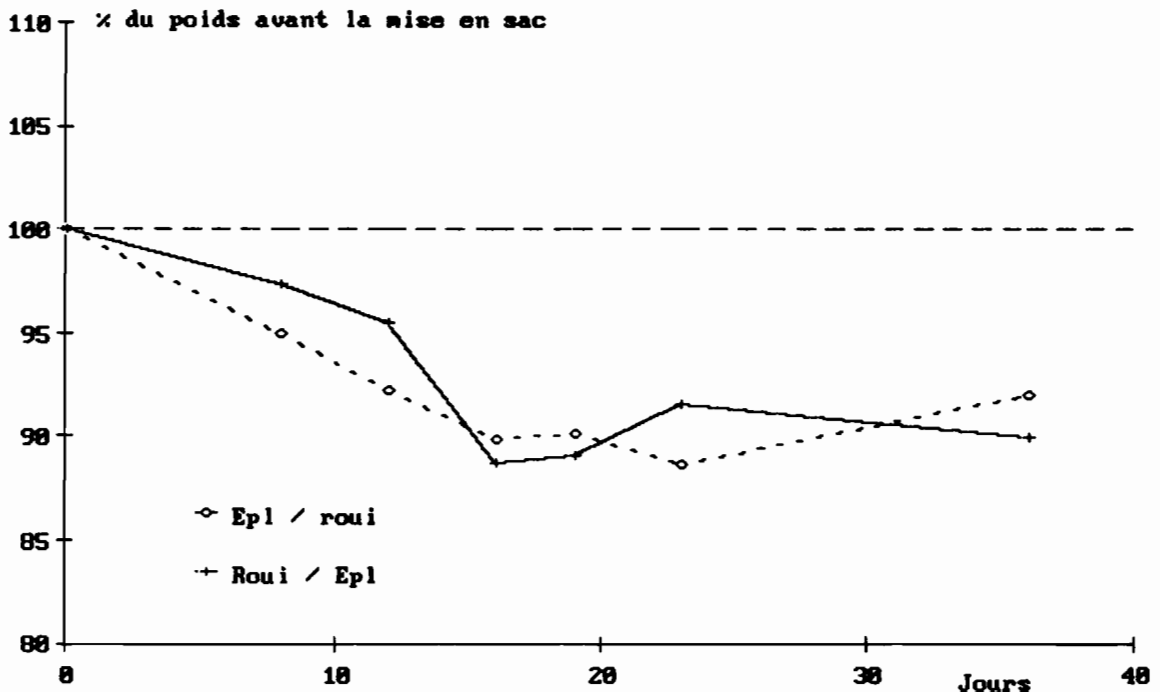


FIGURE 64

pH DES RACINES

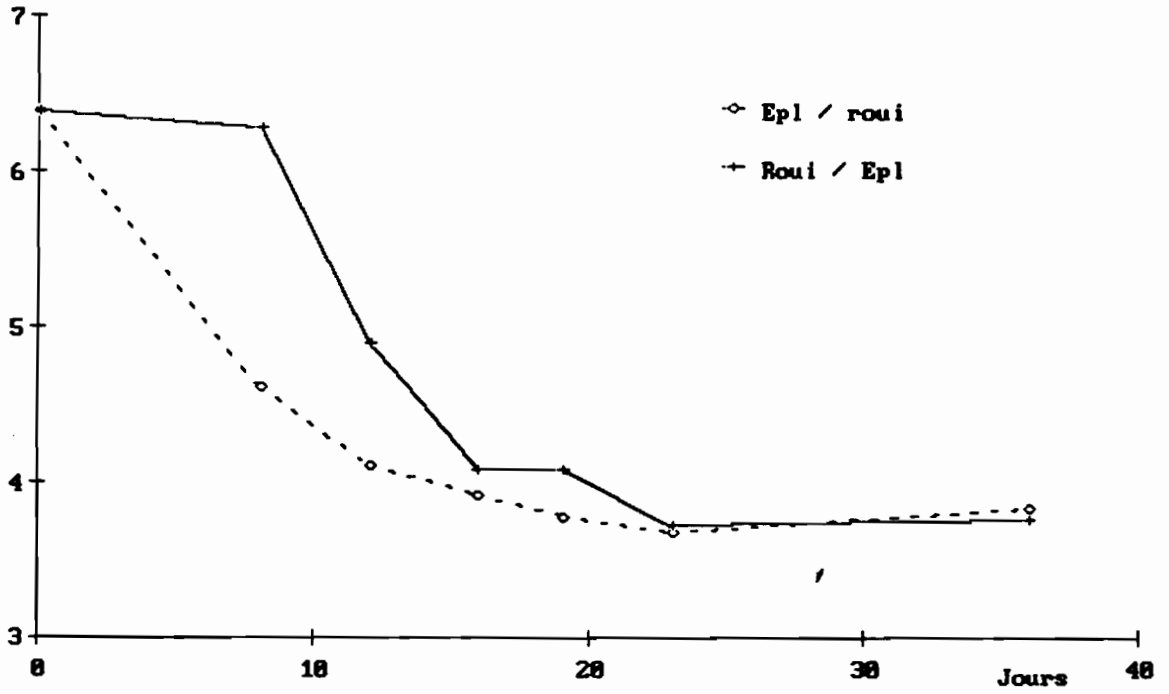


FIGURE 65

TENEUR EN ACIDES TOTALS DES RACINES

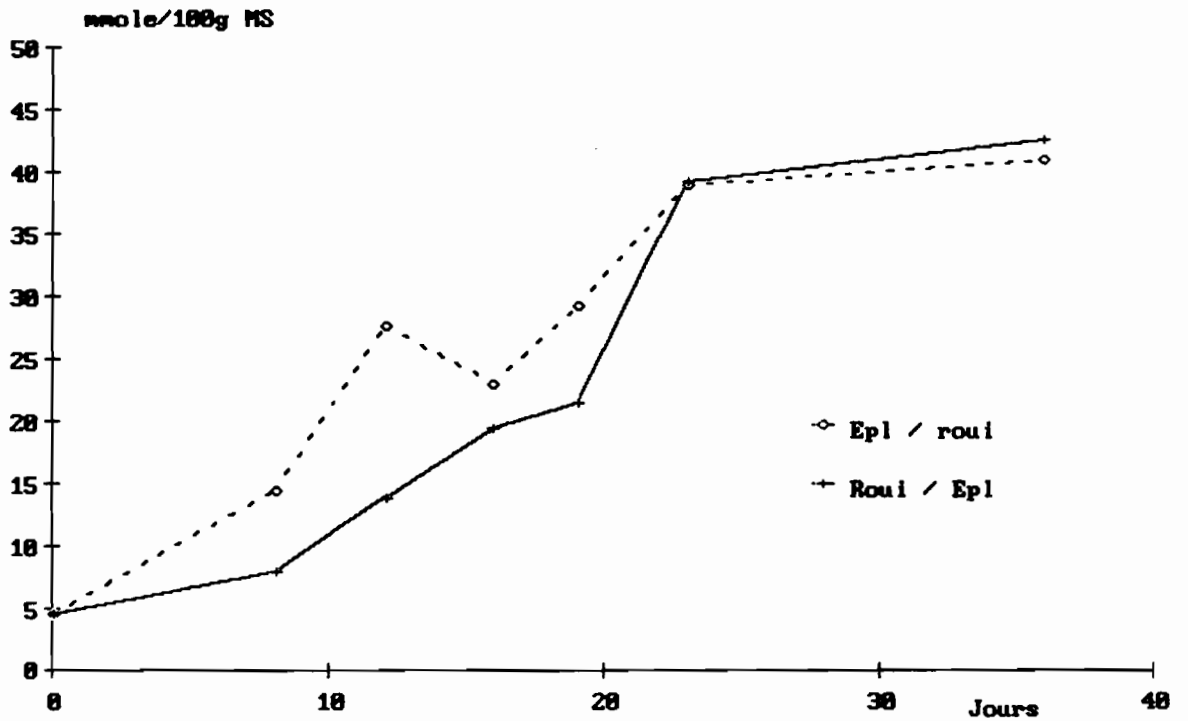


FIGURE 66
 TENEUR EN CYANURES DES RACINES
 ROUIES APRES EPLUCHAGE

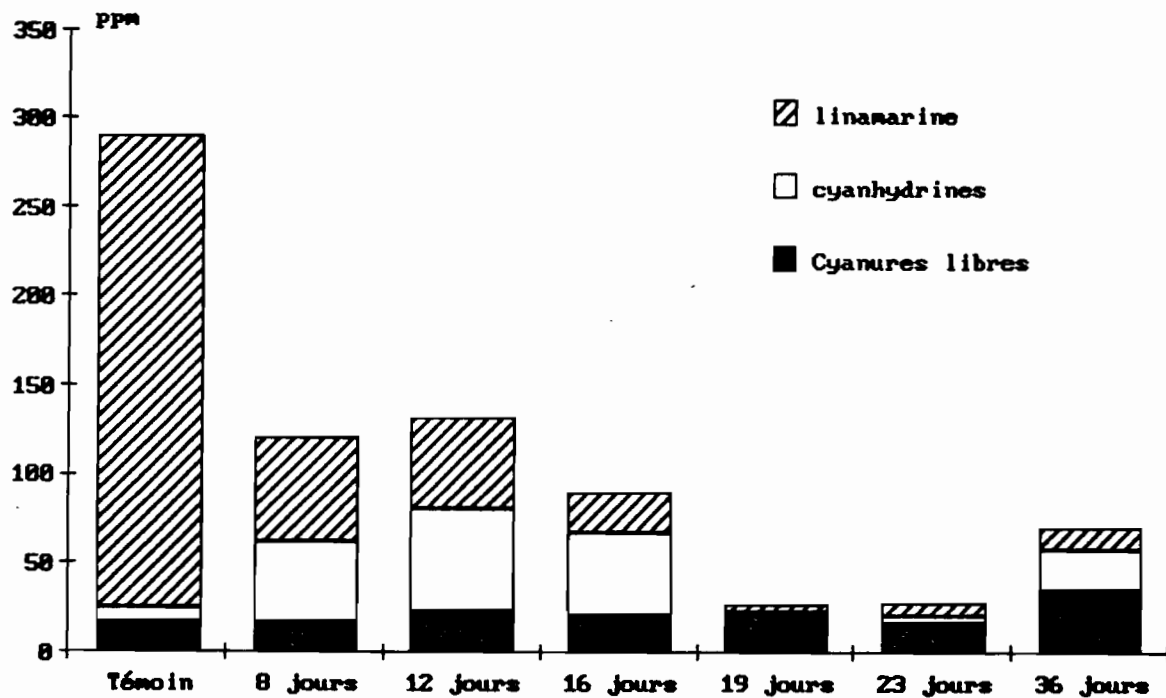


FIGURE 67
 TENEUR EN CYANURES DES RACINES
 ROUIES NON EPLUCHEES

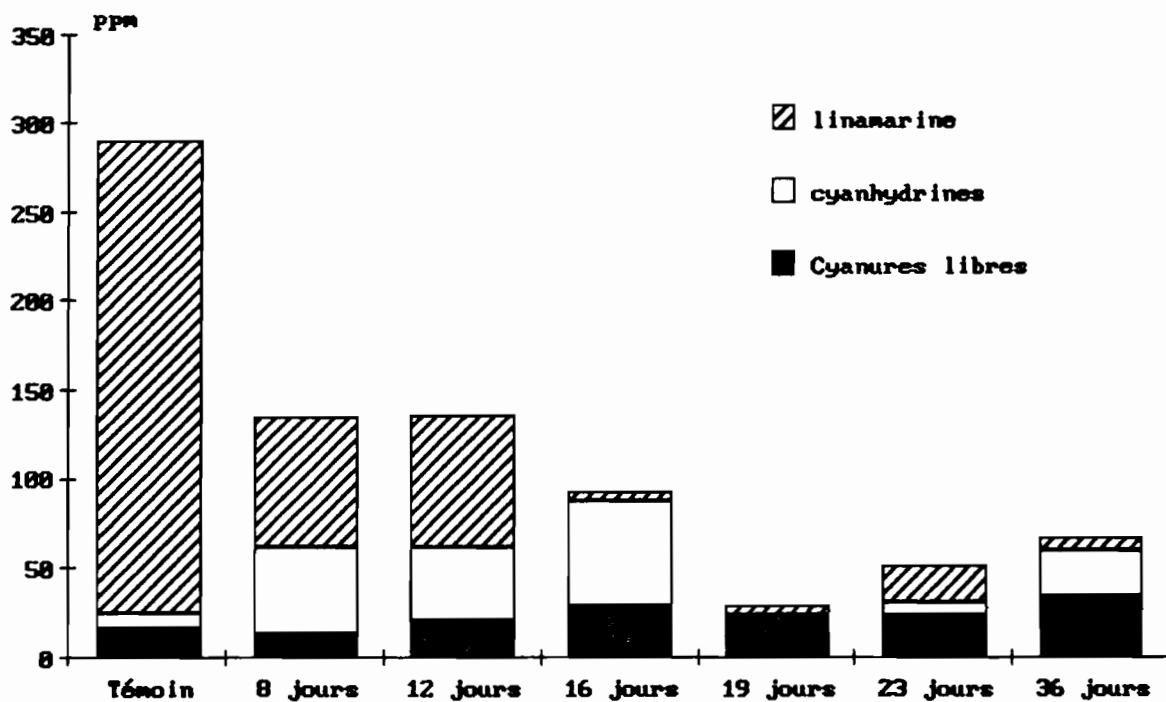


FIGURE 68

ETHANOL

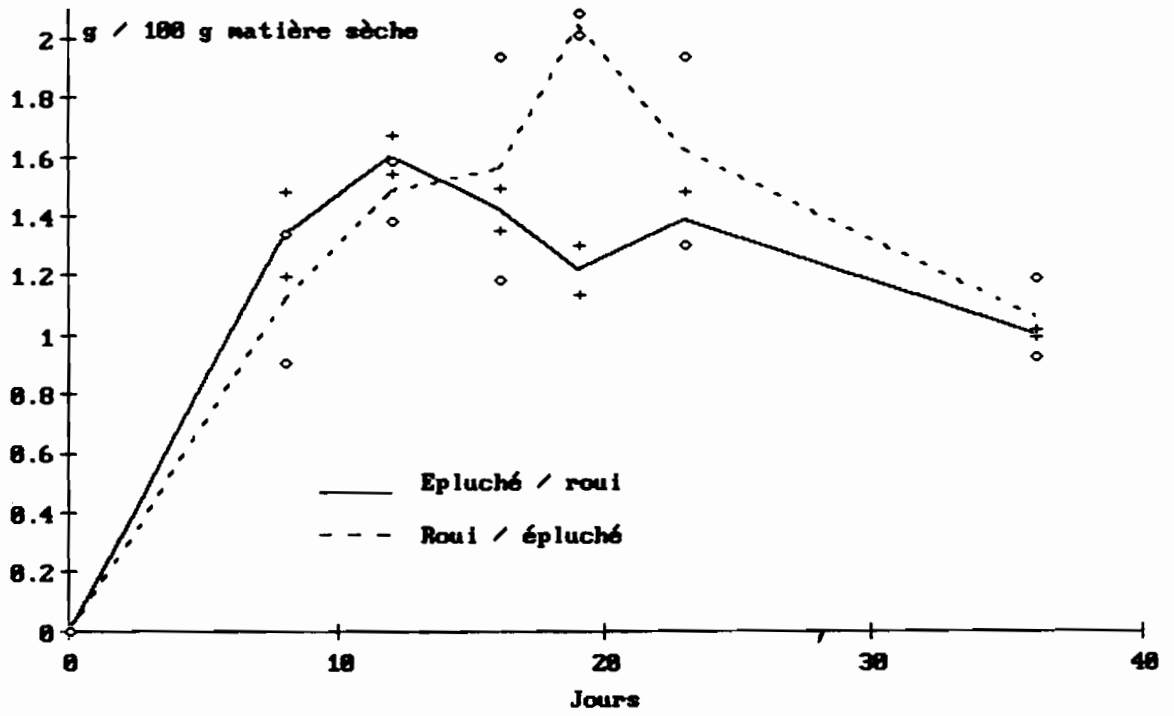


FIGURE 69

ACIDE ACETIQUE

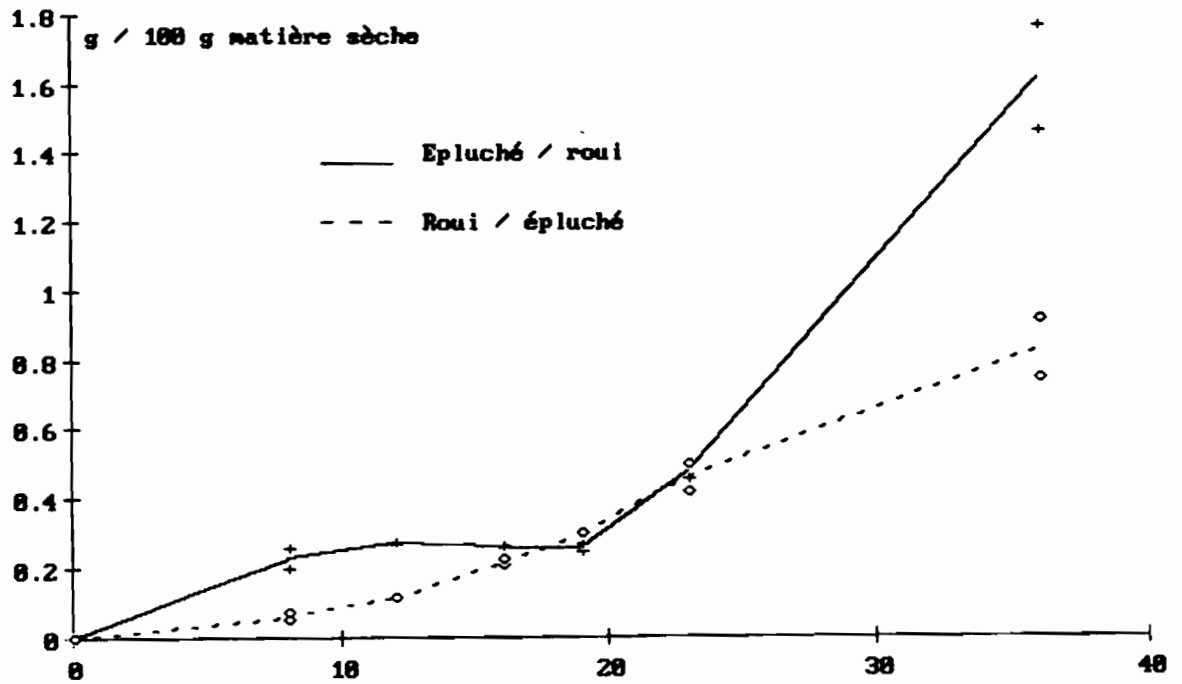


FIGURE 70

ACIDE PROPIONIQUE

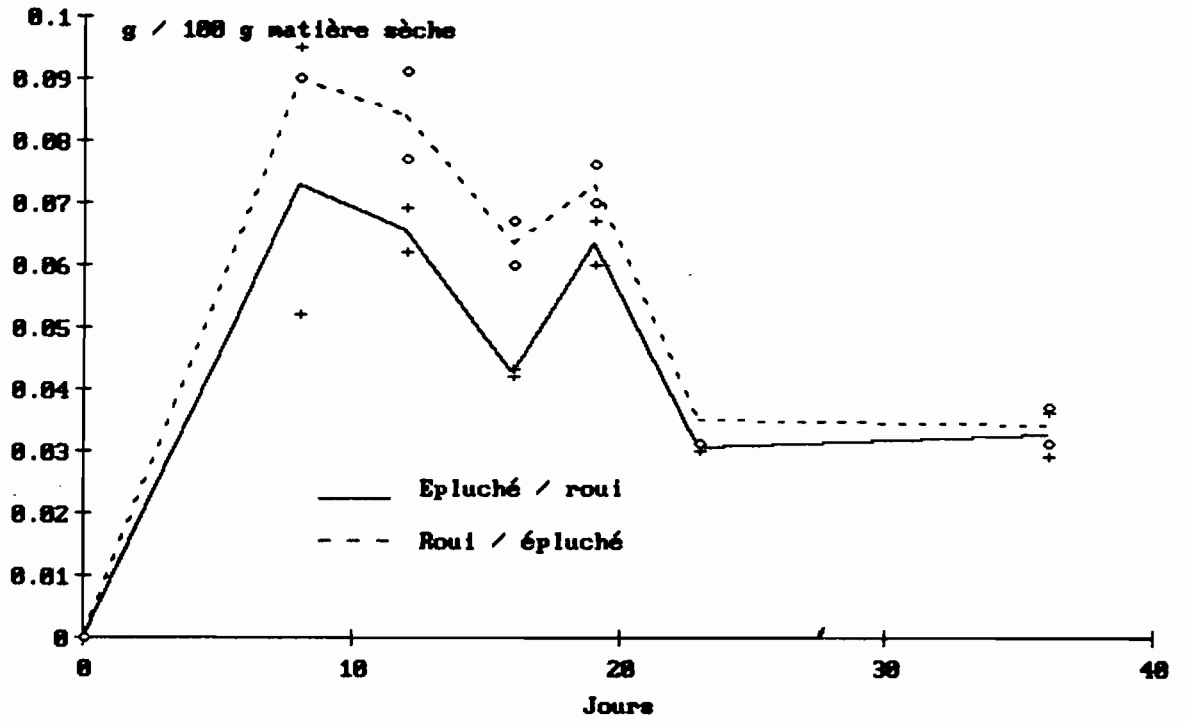


FIGURE 71

ACIDE BUTYRIQUE

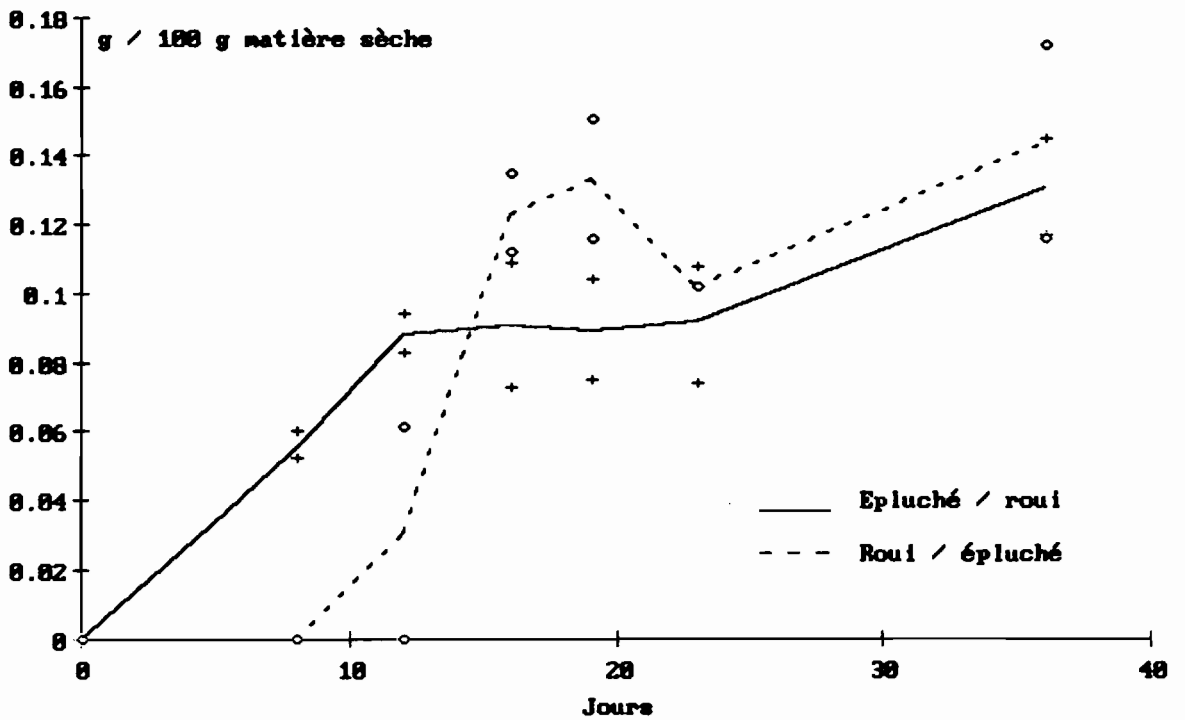


FIGURE 72

FLORE TOTALE AEROBIE

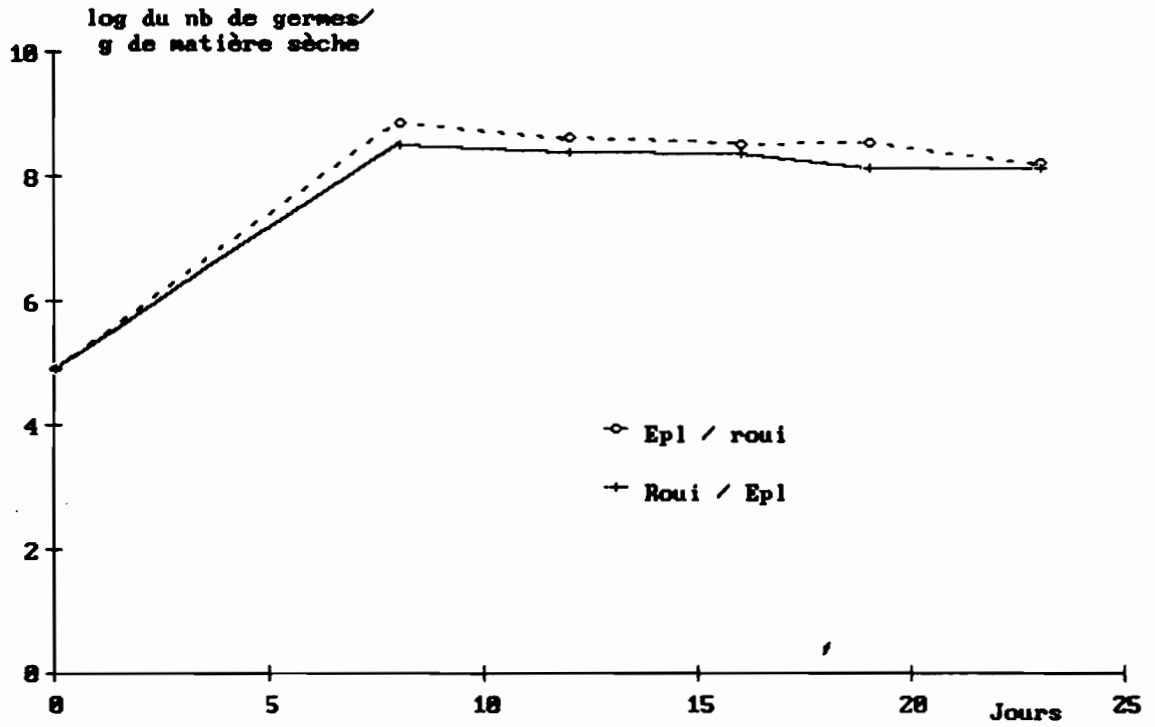


FIGURE 73

FLORE LACTIQUE

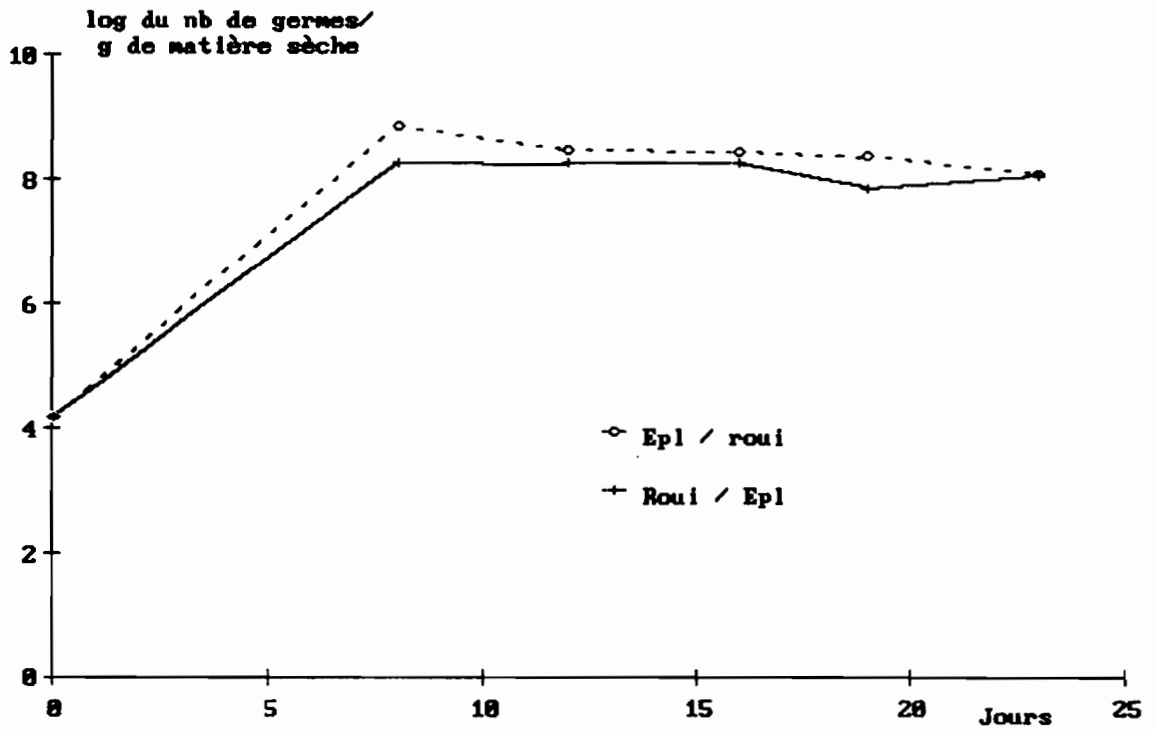
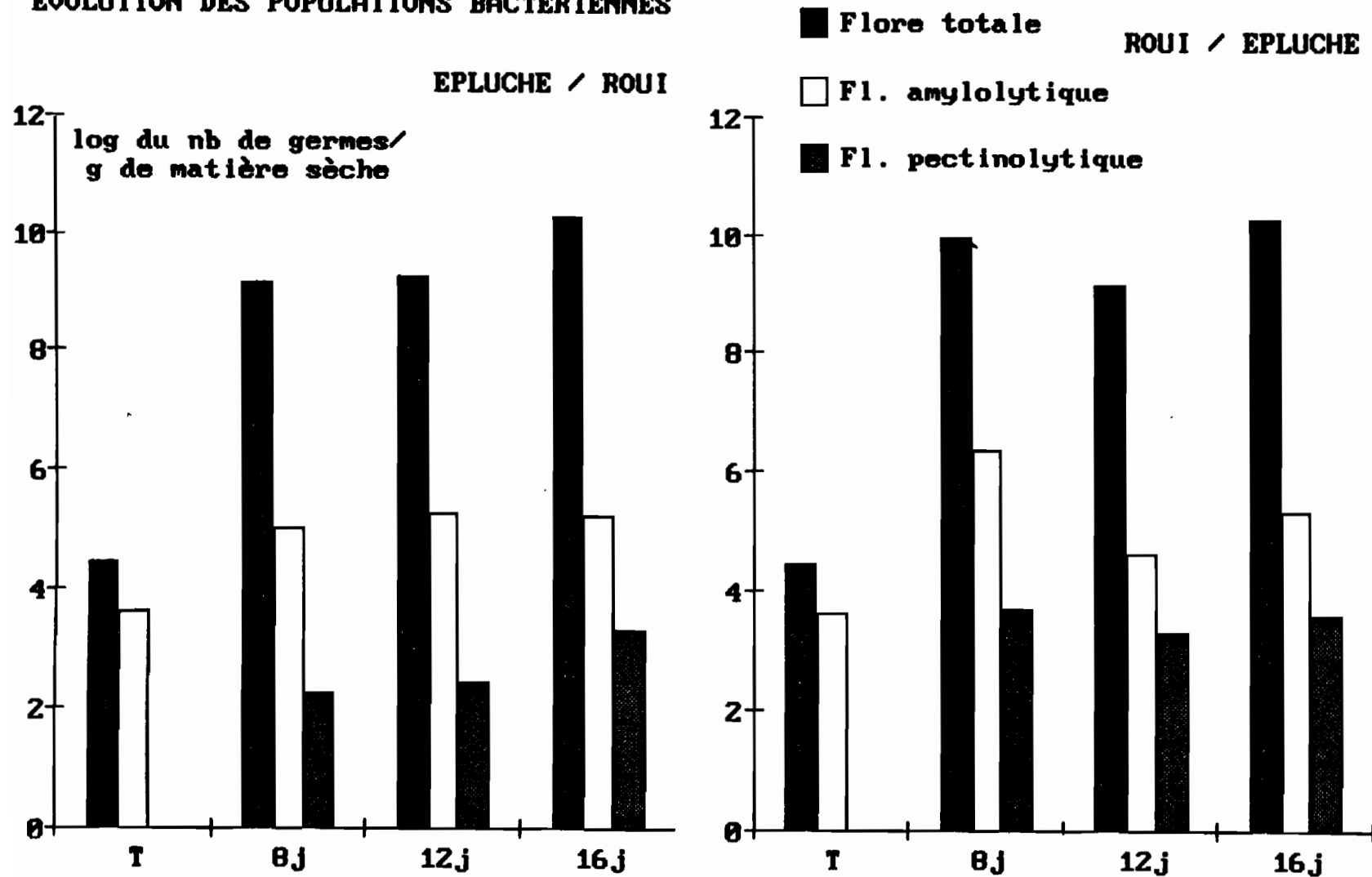


FIGURE 74

EVOLUTION DES POPULATIONS BACTERIENNES



appréciés, principalement pour leur couleur, que les fufous élaborés à partir de racines rouies en sac.

En revanche, la comparaison des fufous provenant de racines non épluchées rouies en sac et en fût, si elle confirme bien l'effet favorable du rouissage humide sur la couleur, a permis d'observer une meilleure consistance et une meilleure impression générale pour les fufous rouis en sac.

La farine élaborée à partir de racines épluchées avant rouissage à un pH inférieur (4,33 contre 5,42), une acidité totale supérieure (7,15 contre 2,80 mmole/100gMS) et une teneur résiduelle en cyanures plus forte (15,4 contre 11,5 ppm) que la farine provenant de racines épluchées après rouissage.

L'acidité et les teneurs résiduelles en cyanures sont beaucoup plus élevées que dans les farines élaborées à partir de racines rouies en fût.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Force est de reconnaître, qu'en dépit des nombreux résultats obtenus, tous les objectifs fixés n'ont pas été atteints.

Dans un contexte rendu difficile par les pannes qui ont affecté les équipements et le retard dans la livraison des commandes, un avancement satisfaisant a toutefois été permis grâce à l'excellente entente entre les différents partenaires intervenant au Congo.

Les résultats obtenus doivent être considérés comme préliminaires à des études plus approfondies qui sont d'ores et déjà menées par plusieurs équipes de chercheurs à Brazzaville (3 microbiologistes Orstom-DGRST, 4 microbiologistes et 2 nutritionnistes de la faculté des sciences de Brazzaville, 1 nutritionniste Orstom et 2 technologues d'Agricongo) en collaboration avec le LPMC (Lab. de Physiologie et Métabolisme Cellulaires) et le LNT (Lab. de Nutrition Tropicale) du Centre Orstom de Montpellier. Pour son prolongement, ce programme bénéficie d'un financement de la CEE (programme STD2 de la DGX11).

Des essais complémentaires sont nécessaires pour relativiser l'importance des sources de variabilité pour chacune des mesures qui seront retenues dans les essais ultérieurs et permettre ainsi l'établissement de protocoles limitant au maximum les variances résiduelles afin d'étudier au mieux les effets de facteurs de variation bien identifiés.

La caractérisation biochimique et microbiologique des transformations survenant au cours du rouissage sera poursuivie: étude de la dynamique des populations bactériennes; identification et isolement des bactéries ayant une action déterminante.

Des essais de modélisation seront entrepris afin de déterminer les conditions optimales de réalisation du rouissage et réaliser des essais d'inoculation par des souches sélectionnées.

Communications, rapports et publications
réalisés dans le cadre du programme.

de LABBEY B. (1989)

Fermentation et détoxification au cours du rouissage du manioc au Congo.
Mémoire en vue d'obtenir le diplôme d'ingénieur ENS.BANA.

NGO N'TAMACK S. (1989)

Essai de corrélation entre les résultats des préférences de consommateurs congolais obtenus par analyse sensorielle et les résultats obtenus à l'issue de mesures instrumentales. Mémoire de DESS, USTL, Montpellier.

TRECHE S. et MASSAMBA J. (1989)

L'importance du manioc dans le modèle de consommation alimentaire congolais. Communication présentée au Colloque Scientifique "40 ans de Recherche scientifique au Congo", 23 Novembre 1989, Brazzaville, Congo.

MASSAMBA J. et TRECHE S. (1989)

Transformations traditionnelles, formes de consommation et formes de commercialisation du manioc en milieu rural congolais. Communication présentée au 4th triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops - Africa Branch, 4-9 Décembre 1989, Kinshasa, Zaïre.

TRECHE S. et MASSAMBA J. (1989)

1. Le rouissage du manioc.
2. Technologies traditionnelles de transformation des racines de manioc.
3. Formes de consommation du manioc en zones rurales au Congo.

Posters présentés au: - Colloque Scientifique "40 ans de Recherche scientifique au Congo", 23 Novembre 1989, Brazzaville, Congo.

- 11ème Salon de l'Alimentation et de l'Industrie Agro-alimentaire de Brazzaville, 13 au 20 janvier 1990, Congo.

TRECHE S. et MASSAMBA J. (1989).

Pour en savoir plus... La consommation du manioc au Congo. Document distribué au 11ème Salon de l'Alimentation et de l'Industrie Agro-alimentaire de Brazzaville (13 au 20 janvier 1990), 8 pages dont 4 de tableaux et figures.

MASSAMBA J., AVOUAMPO E. et TRECHE S. (1990).

Etude et amélioration des modalités d'utilisation du manioc: Problématique, Méthodologie d'approche et Résultats préliminaires. Communication présentée au Séminaire - atelier sur la Mécanisation agricole (DGRMEA/OPMA), 6-8 Juin 1990, Brazzaville, Congo.

3 mémoires de fin d'étude d'étudiants congolais de l'Institut de Développement Rural de Brazzaville, ayant réalisé leur stage dans le cadre du programme, sont en cours de rédaction.

Rapport réalisé en octobre 1990 par S. TRECHE pour l'ensemble des structures participantes au programme à Brazzaville:

- Lab. d'Etudes sur la Nutrition et l'Alimentation (LENA) du Centre ORSTOM de Brazzaville (resp: S. TRECHE).
 - Atelier de transformation des productions agricoles d'AGRICONGO (resp: J. BROCHIER et E. AVOUAMPO).
 - Lab. d'Etudes et de Recherches sur la Physiologie Animale et la Nutrition (LERPAN) de la Faculté des Sciences de Brazzaville (resp: J. MASSAMBA).
 - Lab. de Microbiologie (LM) du Centre Orstom de Brazzaville (resp: A. BRAUMAN)
 - Lab. de Biotechnologies (LB) de la Faculté des Sciences de Brazzaville (resp: D. LOUEMBE).
-

RAPPORT DE FIN D'ETUDE

"Améliorations des mécanismes de détoxification du manioc lors des phases de fermentation"

OPERATION n° 3

- Etudes écophysiologiques des bactéries lactiques intervenant dans le rouissage du manioc"

Maurice RAIMBAULT

Laboratoire de Physiologie et Métabolisme Cellulaires
ORSTOM MONTPELLIER

Novembre 1990

Liste des Participants à l'opération:

-Laboratoire de Physiologie et Métabolisme Cellulaire:
M. RAIMBAULT, E. GIRAUD, B. LELONG

- Laboratoire de Microbiologie ORSTOM-Brazzaville:
A. BRAUMAN, S. KELEKE

- Lab. Biologie Cellulaire, Université Marien N'Guabi:
D. LOUEMBE, M. MALONGA

Ecologie et physiologie des bactéries lactiques

La flore lactique joue un rôle important dans la production d'aliments traditionnels à base de manioc fermenté (gari, chikouangue, amidon aigre ref [1, 2, 3]), ainsi que dans la production industrielle d'aliments lactés (Yougourt, beurre, fromage; ref [4]). Son influence est multiple:

- a) - Conservation des aliments : Par ses propriétés antiseptiques et son action sur le pH du milieu, l'acide lactique produit au cours de la fermentation des sucres limite le développement des microorganismes indésirables (Enterobactéries, Clostridium ...) ref [5] .
- b) - Amélioration des qualités organoleptiques grâce à la formation de certaines molécules volatiles (diacetyl, acetaldehyde, acetoïne...) ref [6, 7, 8] .

Les procédés de fabrication de ces aliments restent cependant tout à fait artisanaux, ref [9] . De plus l'étape de fermentation s'effectuant naturellement sous l'action de la flore lactique épiphyte, la qualité des produits finaux est extrêmement fluctuante .

En vue d'améliorer cette étape de fermentation, donc de mieux maîtriser le processus naturel mis en jeu ici, il a été suggéré d'inoculer en masse le manioc avec une ou plusieurs souches lactiques sélectionnées .

Toutefois, l'effet bénéfique de l'addition d'un inoculum de bactéries lactiques est parfois controversé car il dépend de nombreux facteurs (substrat, température, durée, conditionnement, pourcentage d'inoculation, propriétés physiologiques de la ou des souches inoculantes ...), ref [10] .

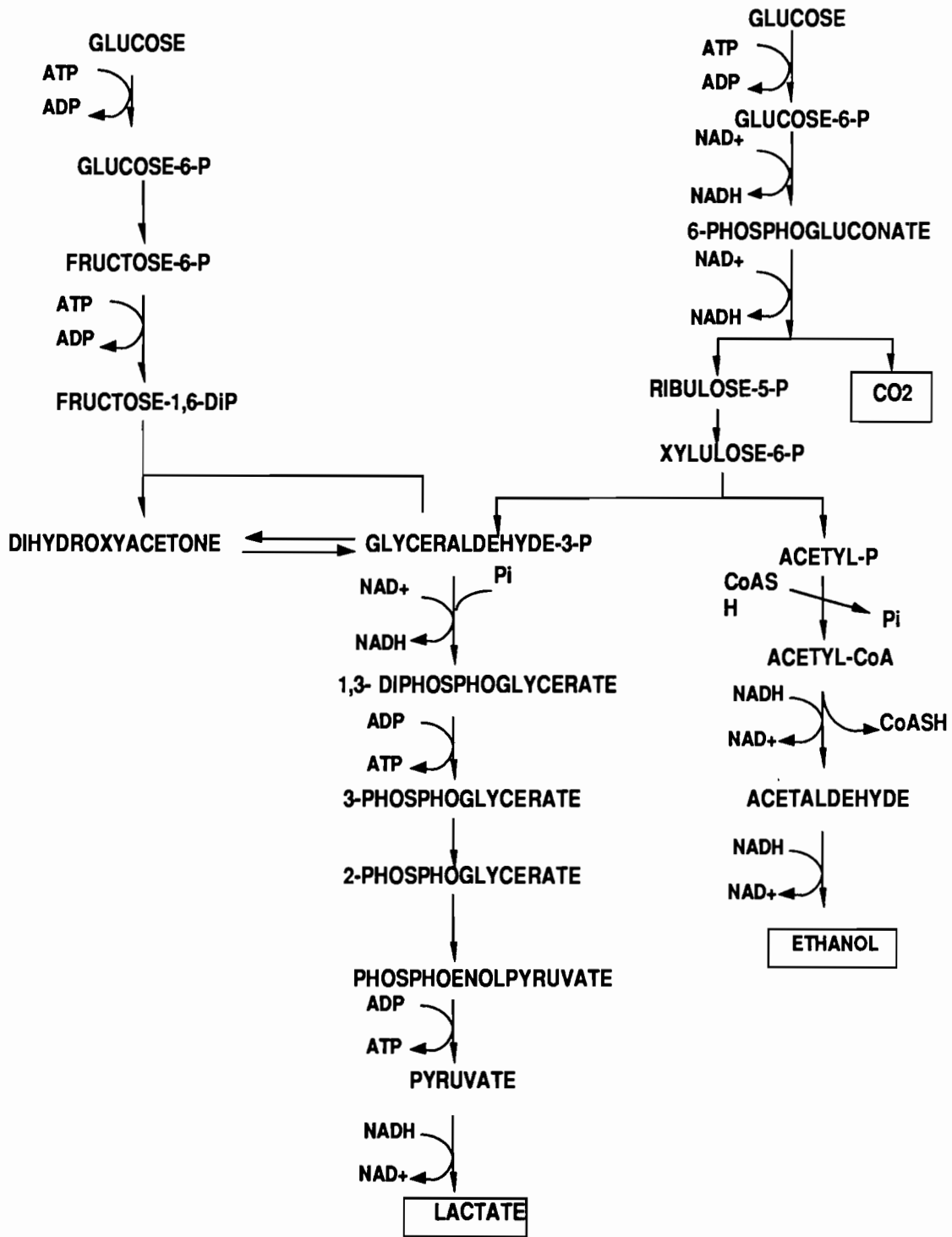
Ainsi certains travaux ref [11, 12] mettent en évidence un effet positif réel lors de l'addition d'un ferment lactique, d'autres, ref [13], ne montrent pas d'avantages substantiels . Il apparaît ainsi qu'il n'existe pas de souches idéales universelles.

Whittenbery (ref [14]) définit les caractéristiques principales d'un bon ferment lactique :

- Avoir un développement rapide afin de rivaliser avec les autres microorganismes de la flore endogène .
- Avoir un métabolisme homofermentaire
- Etre acido tolérant et diminuer le pH au moins à 4 le plus rapidement possible
- Pouvoir fermenter le glucose, le fructose, les pentoses...
- Ne pas produire de dextrane à partir du saccharose ou du manitol à partir du fructose (si du manitol est produit il doit pouvoir le fermenter rapidement)
- Ne pas métaboliser les acides organiques
- Avoir un spectre de température très large
- pouvoir pousser sur de fortes teneurs en matière sèche .

VOIE HOMO FERMENTAIRE

VOIE HETERO FERMENTAIRE



BILAN

1 GLUCOSE $\xrightarrow{\text{(VOIE HOMO FERMENTAIRE)}}$ 2 LACTATE + 2 ATP

1 GLUCOSE $\xrightarrow{\text{(VOIE HETERO FERMENTAIRE)}}$ 1 LACTATE + 1 ETHANOL + 1 CO₂ + 1 ATP

D'autres critères peuvent être également ajoutés:

- Ne pas posséder d'activité protéolytique
- Etre capable de métaboliser l'amidon et éventuellement la cellulose
- Etre génétiquement stable.

Il apparait clairement qu'il est très difficile d'isoler la bactérie lactique qui répondrait à tous ces critères . Les progrès réalisés en biologie moléculaire permettront sans aucun doute de progresser dans cette voie, cependant l'inoculation avec une seule souche d'un milieu non stérile tel qu'un aliment peut poser des problèmes, un mélange stable de bactéries qui réunirait l'ensemble de ces critères aurait plus de chance de se maintenir dans des conditions non aseptiques .

C'est dans cette optique que les travaux réalisés au centre de recherche ORSTOM de Montpellier ont été menés . Tout au long de cette étude, notre objectif a été de mieux cerner la physiologie des bactéries lactiques que l'on sait être relativement complexe . En particulier, la production en masse de ferments lactiques pose un certain nombre de problèmes :

1) La fermentation lactique peut suivre 2 voies métaboliques différentes (voir schéma)

- La voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), homofermentative dans laquelle l'acide lactique est le seul produit final
- La voie de Dickens Horeker et d'Entner Doudoroff, hétérofermentative conduisant à l'acide lactique en mélange avec d'autres produits d'excrétion (CO₂, éthanol, traces de formiate et d'acétate) .

La dégradation d'une molécule de glucose ne permet la libération que de 1 à 2 molécules d'ATP selon la voie métabolique suivie, soit une énergie libre directement disponible très faible entraînant des rendements en biomasse très bas .

2) Ces bactéries sont par ailleurs connues pour leur grande exigence nutritionnelle. Leur culture nécessite la présence de nombreux facteurs de croissance (acides aminés, purine, pyrimidine, vitamines...), ref [16,17], conduisant ainsi à des milieux complexes et donc onéreux .

3) Un autre problème majeur posé par la fermentation lactique concerne l'inhibition de la croissance par l'accumulation de l'acide lactique dans le milieu entraînant ainsi des baisses de rendement et de productivité en biomasse . Le génie biochimique a permis d'apporter quelques solutions en proposant des procédés de fermentation permettant l'extraction en continu de l'acide lactique produit tels que la fermentation avec filtration ultra-tangentielle, ref [18] ou la fermentation en réacteur à lit fluidisé, ref [19] .

Ces procédés améliorent considérablement la productivité en biomasse, mais font généralement appel à des technologies difficilement applicables dans les pays en voie de développement .

1- Etude physiologique des différents groupes de bactéries lactiques

Afin de disposer de données précises sur la physiologie et le métabolisme des bactéries lactiques impliqués dans la fermentation du manioc, nous nous sommes attachés à dans un premier temps à :

- Mettre au point une technique simple en H.P.L.C. permettant le dosage simultané du glucose, de l'amidon, de l'éthanol et des acides acétique, lactique, butyrique, isobutyrique, valérique, isovalérique et propionique
- Obtenir une collection de référence de souches de référence de bactéries lactiques
- Caractériser les différentes souches étudiées par H.P.L.C.
- Etablir les cinétiques et les différents paramètres de fermentation
- Caractériser des échantillons de manioc fermenté par H.P.L.C.

Souches de microorganismes utilisés lors de l'étude

- *Lactobacillus plantarum* (Lacto-labo) et (Boll)
- *Lactobacillus sake*
- *Lactobacillus brevis* DSM 1268 et CNCM 102806
- *Streptococcus cremoris* CNRZ 111
- *Streptococcus lactis* CNRZ 145
- *Lactococcus lactis subsp lactis* CNCM 7056
- *Leuconostoc mesenteroides* INRA 20G
- *Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris* CNCM 103009
- *Leuconostoc dextranicum* INRA 18G
- *Leuconostoc oenos* ATCC 23277
- *Pediococcus damnosus* DSM 20331 et CNCM 102264
- *Pediococcus pentosaceus* CNCM 102260

Milieu de culture utilisé (MRS)

- Peptone pancréatique de caséine10g
- Extrait de levure4g
- Extrait de viande8g
- Acetate de sodium5g
- Citrate d'ammonium2g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g
- $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05g
- Tween 80 1ml

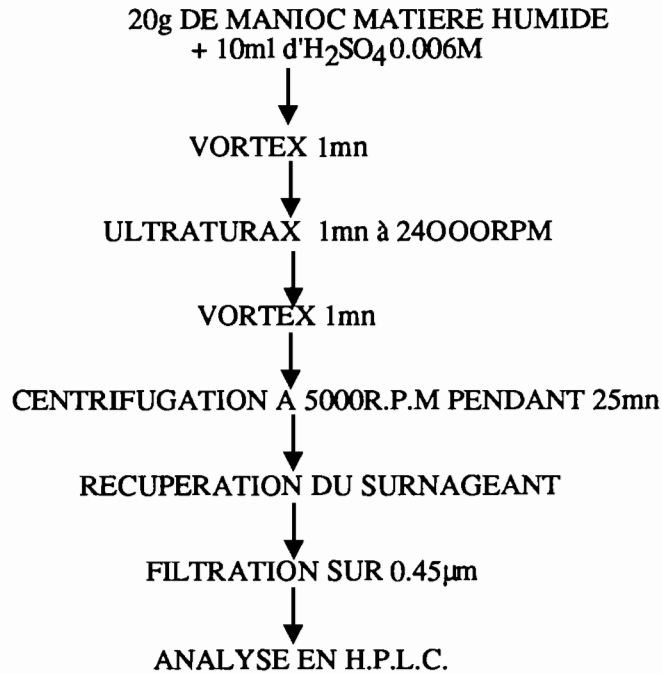
pH ajusté à 6.7-6.8 avant autoclavage. Stérilisation à 110°C pendant 30 mn

Pour les cultures en fermenteurs, la concentration en glucose a été portée à 55, g/l.

PREPARATION DES ECHANTILLONS DE MANIOC ROUI :

10 g de manioc roui sont mis dans une coupelle en aluminium pré-tarée, puis séchés à 105°C pendant 24h . On détermine alors le % de M.S. par simple pesée.

EXTRACTION DES ACIDES GRAS VOLATILS



EXPRESSION DES RESULTATS

La méthode mise au point en H.P.L.C. donne les concentrations en g/l des acides gras volatils et autres composés dans le surnageant récupéré après filtration, pour connaître la teneur des différents constituants en g/100g de M.S. on applique la formule suivante :

$$[\text{Teneur en g/100g de M.S.}] = \frac{(\text{calculé par H.P.L.C.}) \text{ Volume en l} \times 0,03 \times 10000}{20 \times \% \text{ M.S.}}$$

Quantité de manioc en matière humide

METHODE ANALYTIQUE EN H.P.L.C.

Le chromatographe utilisé (Touzart et Matignon) est constitué des éléments suivants :

- **Pompe** : Chromotem 380
- **Vanne d'injection** : vanne rhéodyne 7125 munie d'une boucle de 10 µl
- **Colonne** : Aminex HPX87H (Bio-Rad)
Support : Résine chargée H⁺ (Sulfonate divinyl benzène styrène copolymère)
Principe : Interaction hydrophobe + échange d'ion.
- **Four** : Jones
- **Détecteurs** : 2 détecteurs sont branchés en série
 - . Un détecteur U.V. à 210nm pour la détection des acides organiques (Shimadzu SPD 2A)
 - . Un réfractomètre Knauer pour la détection des sucres, des alcools, des acides organiques...

CONDITIONS : - Eluant : H₂SO₄ 0.006M

- Température : 65°C

- Débit : 0.8ml/mn

MODE OPERATOIRE : Le mode opératoire utilisé est décrit dans un rapport interne : (Dosage des acides gras volatils, amidon, glucose et éthanol par H.P.L.C., ref [20])

1.1 CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DES SOUCHES

Les principales observations des différentes souches étudiées, réalisées sur boîte de Pétri sur milieu M.R.S. et en microscopie optique, sont présentées dans les 2 tableaux de la page suivante .

Quelques caractéristiques intéressantes relevées dans le Bergey's Manual of bacteriology [16, 17] ont été ajoutées dans ces tableaux.

En règle générale, les colonies ont le même aspect : les colonies sont lisses légèrement bombées , régulières, blanches ou opaques, de taille plus ou moins grosses. Les bactéries sont toutes Gram + , sous forme de coque plus ou moins allongé disposé par paire , par chaîne ou par tétrade, pour les genres *Streptococcus* , *Pediococcus* et *Leuconostoc*. Elles ont la forme de petits bacilles pour le genre *Lactobacillus* .

Il apparaît ainsi que l'observation des colonies et l'état frais ne suffit pas pour diffé-

SOUCHE ETUDIEE	REFERENCE COLLECTION	ASPECT DES COLONIES	ASPECT DES BACTERIES	TEMPERATURE DE CROISSANCE	REMARQUES
<i>Lactobacillus plantarum</i>	(Lacto-Labo) (Boll)	Colonie, lisse, régulière, légèrement bombée, couleur crème, Ø 3 mm	petit batonnet, Gram + souvent seul ou en chaîne de 2 ou 3	température optimale 30 à 35 °C, ne pousse pas à 45° C	métabolisme homofermentaire
<i>Lactobacillus sake</i>		colonie lisse, régulière légèrement bombée, couleur blanche, Ø 3 mm	petit batonnet, Gram + souvent seul ou en chaîne de 2 ou 3	pousse bien à 35°C	métabolisme homofermentaire
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 12638 CNCM 102806	colonie lisse, régulière légèrement bombée, couleur blanchâtre opaque, Ø 3 mm	bacille Gram +, de courte taille, parfois en chaîne de 3 à 4 non dissociés	température optimum 30°C, ne pousse pas à 40°C	métabolisme hétérofermentaire
<i>Streptococcus cremoris</i>	CNRZ 111	petite colonie, régulière blanchâtre et opaque, Ø 0,5 - 1 mm	coque Gram +, plus ou moins allongé, par paire ou en chaîne	température optimum 30°C, ne pousse pas à 40°C	métabolisme homofermentaire, forme un peptidoglycan
<i>Streptococcus lactis</i>	CNRZ 145	petite colonie, régulière blanchâtre et opaque, Ø 0,5 - 1 mm	coque Gram +, plus ou moins allongé, par paire ou en courte chaîne	température optimum 30°C, ne pousse pas à 45°C	métabolisme homofermentaire très exigeante sur le plan nutritionnel
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CNCM 7056	petite colonie, régulière blanchâtre et opaque, Ø 0,5 - 1 mm	coque Gram +, plus ou moins allongé, par paire ou en courte chaîne	température optimum 30°C, ne pousse pas à 45°C	souche dénommée avant <i>Streptococcus lactis</i> , changement de classification réf [22]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	INRA 20 G	colonie blanche, régulière lisse Ø 2 mm, légèrement bombée	coque lenticulaire par paire ou en chaîne, Gram +	température optimum 20-30°C, ne pousse pas à une température > à 37°C	métabolisme hétérofermentaire, formation d'une fine couche de dextrane en présence de saccharose

SOUCHE ETUDIEE	REFERENCE COLLECTION	ASPECT DES COLONIES	ASPECT DES BACTERIES	TEMPERATURE DE CROISSANCE	REMARQUES
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	CNCM 103009	colonie blanche, translucide à la périphérie, régulière, Ø 2 à 3 mm	coque sphérique ou lenticulaire en longue chaîne dans laquelle les cellules apparaissent par paire, Gram +	température optimum 18-25°C, ne pousse pas à une température > à 30°C	métabolisme hétérofermentaire très exigeante en amino acide. souche dénommée avant <i>Leuconostoc cremoris</i>
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	INRA 18 G	colonie blanche, lisse, légèrement bombée, régulière, Ø 2 mm	coque Gram +, lenticulaire par paire ou en courte chaîne	température optimum 20-30°C, ne pousse pas à une température > à 37°C	métabolisme hétérofermentaire, forme du dextrane à partir du saccharose
<i>Leuconostoc oenos</i>	ATCC 23277	sur MRS, colonie translucide non visible à l'oeil	coque Gram+, de très petite taille, en courte chaîne	température optimum 18-24°C, ne pousse pas à une température > à 35°C	métabolisme hétérofermentaire pousse très mal sur milieu MRS, croissance très longue, responsable de la fermentation malolactique du vin
<i>Pediococcus damnosus</i>	DMS 20331 CNCM 102264	colonie blanche crème, légèrement jaunâtre, régulière, lisse, légèrement bombée, Ø 2mm	coque Gram +, par paire ou en tétrade	température optimum 25°C, ne pousse pas à 35°C	métabolisme homofermentaire appelé plus couramment <i>pediococcus cerevisiae</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CNCM 102260	Colonie blanche, régulière, lisse, Ø 3 mm	coque Gram +, par paire ou en tétrade	température optimum 35° C, température maximum 42-45° C	métabolisme homofermentaire, redoutées dans les brasseries, souvent appelées sarcines

rencier des principaux genres des bactéries lactiques et encore moins à celle des espèces. Des tests biochimiques supplémentaires se révèlent donc indispensables pour pouvoir identifier les différentes souches (Test API) .

1.2 - CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES SOUCHES

Il a été montré récemment que l'H.P.L.C. pouvait être utilisée pour suivre simultanément plusieurs paramètres de fermentation (glucose, ethanol, acide lactique, acide acétique) ref [19, 21], diminuant ainsi considérablement le nombre de dosages et les temps d'analyse .

Ainsi, afin de mieux caractériser les différentes souches lactiques et la présence de certains métabolites dans le manioc roui, nous avons mis au point une technique simple par H.P.L.C. permettant le dosage simultané du glucose, ethanol, amidon et acides gras volatils (lactique, acétique, butyrique, isobutyrique, propionique, valérique et isovalérique) . C'est la méthode qui a ensuite été utilisée pour les résultats présentés dans la partie du travail réalisé au Congo.

1.3- ANALYSE DES SURNAGEANTS DE CULTURE EN FIOLE

D'une façon générale, pour l'ensemble des souches, nous avons pu quantifier au cours des cultures : - La consommation plus ou moins importante du glucose suivant la souche
- La production d'acide lactique et pour certaines souches d'éthanol , ou d'acide acétique
- L'absence de production des acides propionique, butyrique, isobutyrique, valérique et isovalérique.

Les chromatogrammes obtenus sont relativement similaires, peu de pics étant spécifiques propres des souches étudiées, à l'exception :

- D'un pic à 14,62min détecté en UV pour les souches de *Lactobacillus brevis*
- D'un pic plus important à 25min en UV pour les souches *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides*
- D'un pic beaucoup plus important à 17,11min en UV pour les souches *Lactobacillus plantarum*

Nous n'avons pas cherché à identifier ces composés correspondant à ces pics particuliers de façon plus précise, par manque d'équipements et de temps.

Il apparaît ainsi qu'il n'est pas possible d'identifier une souche uniquement à partir des chromatogrammes obtenus en H.P.L.C.; cependant en calculant les rendements d'Acide lactique/composés volatils (Acides lactique, acétique et éthanol) et Acide lactique/glucose consommé nous avons pu déterminer le caractère homo ou hétérofermentaire d'une souche. Des rendements entre 80% et 100% sont caractéristiques d'une souche homolactique, des rendements inférieurs à 60% caractérisent une souche hétérolactique. Nous avons pu ainsi vérifier le caractère hétérolactique de souches appartenants aux genres *Leuconostoc* et de la souche *Lactobacillus brevis*, le caractère homolactique des souches appartenant aux genres *Streptococcus* et *Pediococcus* et de certaines souches du genre *Lactobacillus*.

Compte tenu que l'objectif est de provoquer une baisse rapide du pH et d'obtenir une production importante d'acide lactique, les résultats obtenus suggèrent que parmi les souches étudiées, *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus pentosaceus* sont les plus favorables. Les souches du genre *streptococcus* et *leuconostoc* dans les conditions étudiées ne semblent pas satisfaire à ces 2 critères.

1.4- CULTURE DES SOUCHES EN REACTEUR

Afin d'estimer les possibilités de production en masse de ferments lactiques, la croissance des différentes souches de notre collection a été étudiée dans les mêmes conditions en réacteur Biolafitte de 2 litres avec régulation de pH.

Les courbes des cinétiques de fermentation (D.O., poids sec, glucose, acide lactique et éthanol) de certaines souches sont présentées. Un tableau comparatif des principaux paramètres de fermentation (Taux de croissance, Temps de génération, Yp/s lactique, Yp/s éthanol, acide lactique finale, biomasse finale et durée de la fermentation jusqu'à épuisement du glucose) est également présenté.

D'une manière générale, nous avons observé pour l'ensemble des souches étudiées :

- Une assimilation totale du glucose
- Une croissance comportant 3 phases : une phase exponentielle plus ou moins longue suivie d'une phase de ralentissement et d'une phase stationnaire, nous n'observons pas à l'exception de *lactobacillus plantarum* de phase de latence. (remarque : l'optimum de croissance est généralement atteint après 10 à 12 heures d'incubation)

SOUCHE	μ en h ⁻¹	Tg en h	Yx/s final en g/g	Yx/s de croissance en g/g	Yp/s LACT en g/g	Yp/s EtOH en g/g	BIOMASSE en g/l	LACTIQUE en g/l	ETHANOL en g/l	DUREE en h
<i>Lactobacillus plantarum (lacto labo)</i>	0,43	1,6	0,15	0,167	0,75	-	8,2	39,3	-	12-16
<i>Lactobacillus sake</i>	0,43	1,6	0,079	0,119	0,8	-	4,2	42,4	-	23-25
<i>Lactobacillus brevis CNCM 102806</i>	0,41	1,69	0,044	0,053	0,41	0,23	2,24	20,67	11,65	27-29
<i>Streptococcus lactis CNRZ 145</i>	0,59	1,18	0,081	0,09	0,82	-	4,1	41,5	-	23-25
<i>Streptococcus cremoris CNRZ 111</i>	0,55	1,26	0,018	0,067	0,85	-	1	42,7	-	58-60
<i>Leuconostoc mesenteroides INRA 20G</i>	0,43	1,61	0,03	0,035	0,47	0,22	1,81	23,4	10,8	12-14
<i>Leuconostoc dextranicum INRA 18G</i>	0,4	1,74	0,038	0,038	0,45	0,22	2,08	22	10,42	23-25
<i>Leuco mesent subsp cremoris CNCM 103009</i>	0,2	3,64	0,034	0,034	0,43	0,2	1,96	23,26	10,65	55-57
<i>Pediococcus pentosaceus CNCM 102260</i>	0,46	1,5	0,095	0,113	0,75	-	5,6	41,8	-	10-12
<i>Pediococcus damnosus DSM 20311</i>	0,092	7,5	0,03	0,037	0,815	-	1,77	41,8	-	65-75

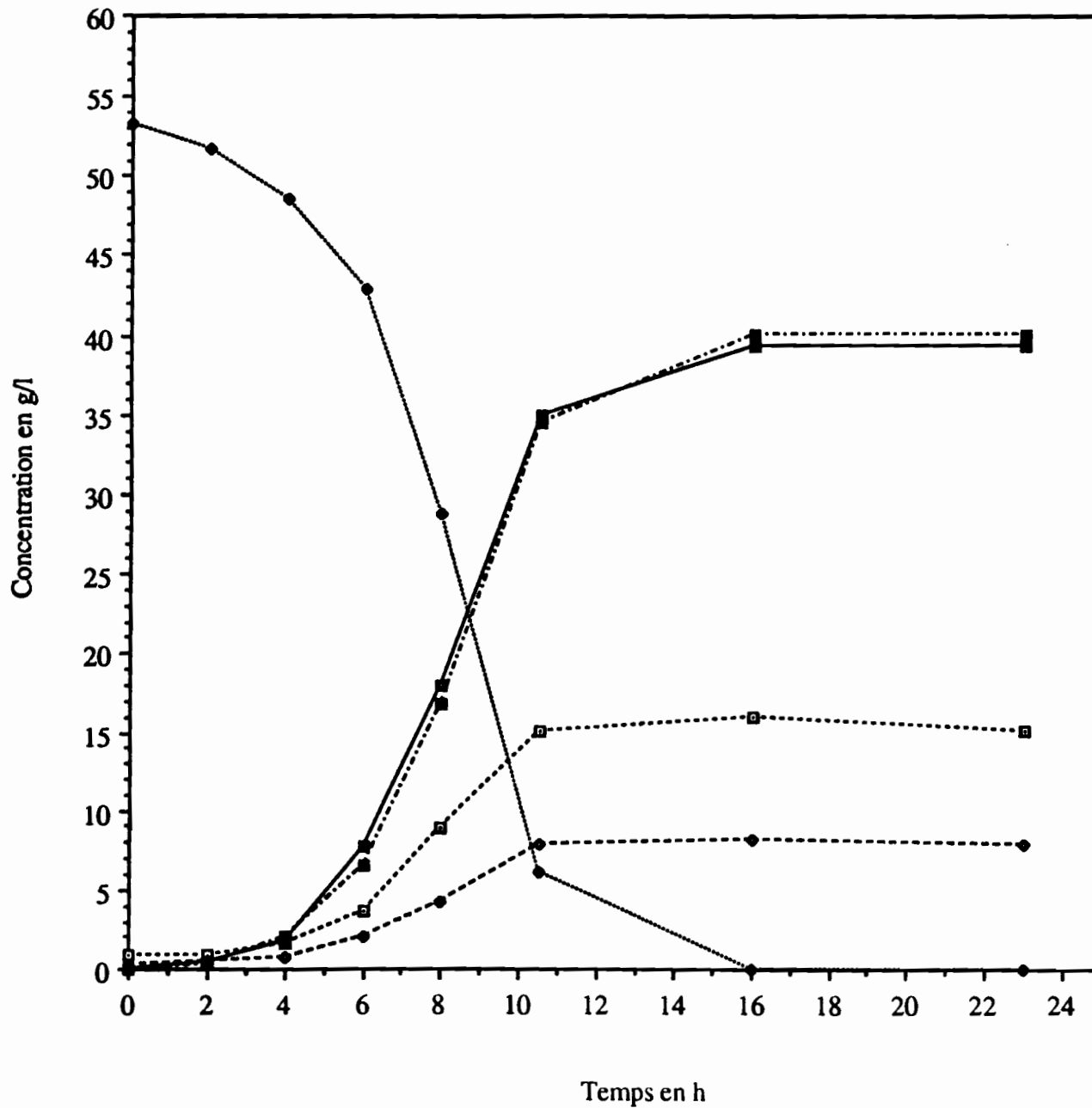
Tableau comparatif des principaux paramètres de fermentations des différentes souches étudiées

REMARQUE: - Le taux de croissance (μ) est calculé à partir des valeurs de la densité optique

- le rendement en biomasse de croissance (Yx/s de croissance) est calculé à la fin de la phase de croissance

- le rendement en biomasse final (Yx/s final) est déterminé à la fin de la fermentation, c'est à dire après consommation totale du glucose

Suivi des paramètres de fermentation de *Lactobacillus plantarum* (Lacto-labo)



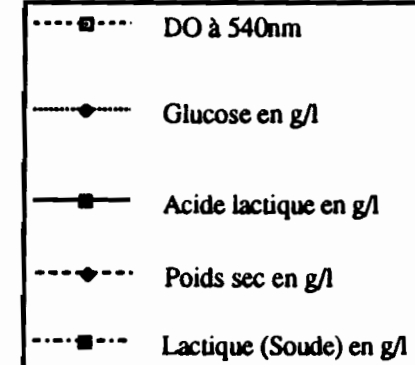
PARAMETRES DE FERMENTATION

$\mu = 0,43 \text{ h}^{-1}$

$T_g = 1,6 \text{ h}$

$Y_{x/s} = 0,15 \text{ g/g}$

$Y_{p/s} = 0,75 \text{ g/g}$



- Des temps de génération et des taux de croissance relativement proche d'une souche à l'autre (A l'exception des souches *Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris* et *Pediococcus damnosus* qui ont des taux de croissance beaucoup plus faible)

- Une production d'acide lactique jusqu'à épuisement du glucose dans le milieu (remarque : certaines souches continuent à produire de l'acide lactique alors qu'elles se trouvent dans une phase stationnaire de croissance, ceci met en évidence un phénomène de découplage énergétique)

- Des rendements et des teneurs en acide lactique très similaires suivant le caractère homo ou hétérofermentaires des souches .

Par contre, nous constatons que les rendements en biomasse sont très différents d'une souche à l'autre . En effet, dès les premières heures de culture, certaines bactéries passent en phase de ralentissement, phénomène que l'on peut imputer à des exigences nutritionnelles bien spécifiques, à une inhibition par certains constituants présents ou produits dans le milieu ou à des conditions de culture (Température, pH, air dissous..) non favorables . Dans ce cas, les rendements obtenus sont extrêmement faibles .

Puisque le critère le plus important à retenir lors de la sélection d'une souche pour servir de ferment lactique sera sa capacité à être produite en masse, les souches *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus pentosaceus* sont les plus performantes . Il est à rappeler que nous avons observé précédemment que ces 2 souches étaient également les plus aptes à provoquer une baisse rapide de pH et produire de fortes teneurs en acide lactique.

Cette étude nous a permis également révélé un comportement différents des souches en fonction de la régulation ou non au pH. En effet nous avons observé précédemment en fiole qu'après 45 heures de culture, les souches du genre *Streptococcus* et les souches *Pediococcus damnosus* et *Lactobacillus sake* n'avaient consommé qu'une faible quantité de glucose initialement présent. En réacteur, alors que la concentration initiale est 2,5 fois plus importante, la totalité du glucose est consommé et ceci plus rapidement . Les conditions de culture, à l'exception de la régulation du pH étant sensiblement les mêmes, nous pouvons conclure que le maintien du pH à une valeur déterminé permet un découplage énergétique, indiquant l'action inhibitrice du pH joue essentiellement sur la biosynthèse et l'assimilation du glucose plutôt que sur la voie de dégradation du glucose en acide lactique produisant l'énergie de croissance .

Cette première étape a été réalisée dans le but de disposer d'une méthodologie d'étude et de données plus précises sur la physiologie des bactéries lactiques en générale et pour étudier les bactéries isolées su manioc en terme de référence.

Les résultats obtenus à partir des analyses HPLC des jus de fermentation ont mis en évidence:

- Le caractère homo ou hétérolactique des différentes souches étudiées
- Une sensibilité des souches du genre *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* à des pH acides
- L'absence de production d'acide propionique, butyrique, isobutyrique, valérique et isovalérique
- La spécificité de la cinétique de croissance de chacune des souches en réacteur
- La difficulté de produire en masse un ferment lactique

Il apparaît que parmi les souches étudiées, *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus cerevisiae* (avec une préférence pour *L.plantarum*) semblent être les plus intéressantes pour constituer un bon ferment lactique. En effet, elles sont homolactiques, elles ont une croissance rapide, elles sont acido tolérantes et permettent de diminuer rapidement le pH en dessous de 4, elles excrètent de fortes quantités d'acide lactique et elles donnent, dans les conditions étudiées les meilleurs rendements en biomasse, elles sont ainsi les plus susceptibles à pouvoir être facilement produites en grande quantité.

Il est à noter, que les principales études effectuées sur ferment lactique en ensilage sont généralement réalisées avec *Lactobacillus plantarum*, ref [11, 12, 13].

L'analyse complémentaire d'échantillons de manioc roui par H.P.L.C. nous a permis de confirmer une participation importante de la flore lactique lors du rouissage, quoique la détection d'acides butyrique, propionique, valérique et isobutyrique, non produits par la flore lactique, indique l'intervention d'autres microorganismes au cours de cette étape de fermentation.

L'ajout d'un ferment lactique pourrait donc comme il a été démontré dans la bibliographie, ref [12,4], inhiber le développement de cette flore épiphyte et diminuer ainsi les teneurs de ces différents acides gras volatils. Il reste cependant à déterminer si la suppression de ces acides ne conduirait pas à l'obtention de produits finaux (chikwangue, gari...) acceptés ou jugés insipides pour le consommateur.

Pour la suite des travaux nous avons utilisés largement ces méthodologies d'analyse et de cultures.

2- Ecophysiologie des bactéries lactiques lors du rouissage.

2.1 Etude de la dynamique des populations bactériennes impliquées dans le rouissage

Les résultats de la variabilité "intra-fût" étant exposés et discutés dans le rapport de M. TRECHE, il ne sera mentionné dans ce rapport que les résultats relatifs à la numération bactérienne.

Les types de populations à étudier ont été déterminés en fonction de critères métaboliques et non pas taxonomiques:

BAF : bactéries aérobies facultatives cultivées sur milieu PCA (Plat Count Agar)

BANT : Bactéries fermentaires anaérobies totale incubées sur milieu liquide réduit, supplémenté en glucose et lactate

BL : Bactéries lactiques cultivées sur milieu MRS (de Mann et Rogosa) en anaérobiose

BAM : Bactéries amylolytiques cultivées sur milieu JP2, la révélation de l'activité amylase se faisant après 48 h d'incubation à l'aide de cristaux d'iodes

LEV : levures cultivées sur PDA + chloramphénicol (0,5 g/l)/

On trouvera en annexe n°2 les différents milieux de culture qui ont été utilisés pour suivre l'évolution de la microflore lactique en comparaison avec la microflore totale, la microflore anaérobie et les levures.

Les résultats de ces numérations, présentés dans l'annexe1, montrent que les bactéries lactiques se développent essentiellement pendant les 3 premiers jours de rouissage. A partir du quatrième jour, les bactéries anaérobies deviennent prépondérantes et se maintiennent à un niveau très élevé. Quant aux levures, leur nombre reste relativement limité, mais augmente régulièrement tout au long du processus de rouissage. Les bactéries amylolytiques suivent le même profil que les bactéries lactiques. Quant aux bactéries pectolytiques, leur nombre est très constant, mais la méthode et le milieu de culture utilisés sont peut-être à revoir.

Les populations bactériennes dénombrées sur le manioc au cours du rouissage sont importantes ($\sim 10^9$ bact totales/g de manioc). Elles semblent composées majoritairement de bactéries lactiques et/ou de bactéries fermentaires anaérobies. Le nombre élevé de bactéries présentant un caractère amylolytique ($\sim 10^7$ /bact / g) pose le problème de l'importance de l'amylyse dans la phase de rouissage.

La variation de la teneur en O₂ dissout (annexe 4) dans l'eau de rouissage, comparé à un témoin sans racines montre, qu'après 1 jour, les conditions sont proches de l'anaérobiose, et que les germes aérobie strictes ne peuvent plus se développer. Les bactéries lactiques, les levures fermentaires et la microflore anaérobie acidophile sont donc favorisés. Il aurait été très utile de pouvoir corrélérer sur cette même cinétique la mesure du potentiel d'oxydo-réduction, mais malheureusement l'appareillage nécessaire n'était pas disponible. La chute de l'oxygène dissout est encore plus rapide que la chute de pH que nous avons rapporté précédemment.

Les populations bactériennes et les principaux paramètres physico-chimiques (pH, pO₂, cyanures totaux cf rapport de M. TRECHE) se stabilisent entre le deuxième et le troisième jour de rouissage.

En annexe 5, on a présenté un exemple de cinétique d'accumulation d'éthanol et d'acides gras volatils dans la racine de manioc, les dosages ayant été réalisés en HPLC selon la méthode précédemment décrite. On s'aperçoit que c'est l'éthanol qui s'accumule en premier, probablement lié au développement de certaines levures. L'acide lactique devient le métabolite prédominant après 5 jours de rouissage. On notera également la présence d'acide butyrique qui n'est pas un métabolite produit par la microflore lactique, mais par d'autres microorganismes anaérobies, et en particulier par les Clostridium.

Cette production de lactate peut s'expliquer par un phénomène de découplage énergétique des populations lactiques, phénomène connu chez ces bactéries. La production de butyrate peut provenir soit d'une fermentation clostridienne acéto-butyrique, soit d'une fermentation provenant de levures. Cette dernière hypothèse semble être la plus probable car :

- a) les clostridii se développent mal en milieu acide,
- b) les levures ont un métabolisme important en anaérobiose pouvant compenser leur faible biomasse (10⁴ levures / g).

Le manioc contient relativement peu de pectinases, cependant les cellules végétales des tubercules de manioc, comme tous les autres végétaux comportent de la pectine comme un des constituants des parois cellulaires, qui donnent au tubercule sa structure solide. L'effondrement de cette texture en une pâte fluide lors du rouissage, nous a conduit à rechercher des activités enzymatiques liées à cette destruction de la paroi végétale. Les pectinases ont en particulier bien connues comme constituants des enzymes de macération. Pour cette raison nous avons voulu savoir si des activités pectolytiques étaient liées au processus de rouissage.

La numération des bactéries pectinolytiques par la méthode des puits en milieu solide n'a pas donné de résultats concluants. Cependant l'analyse des activités pectinolytiques a mis en évidence une forte activité pectine estérase (annexe 6) et une faible activité endopectinase. La lyse importante des membranes pectocellulosiques des tubercules rouis, observée au microscope optique, ainsi que le ramollissement des tubercules rouis démontrent sans ambiguïté l'importance de ce processus dans le rouissage.

Cette observation est très importante, car nos recherches peuvent s'orienter vers le contrôle de cette activité pectolytique caractéristique du processus de rouissage, et non seulement vers le contrôle des activités amylolytiques.

En conclusion, la phase de rouissage des tubercules de manioc semble donc correspondre à une fermentation lactique hétérofermentaire d'un produit amylacé, avec comme caractéristique, une dégradation importante des membranes pectocellulosiques et une production importante d'acides gras volatils.

2.2. Isolement et caractérisation des microorganismes

Dans une seconde étape nous avons plus particulièrement étudié les microorganismes ayant un rôle métabolique important dans la fermentation du manioc: germes amylolytiques et pectinolytiques.

Des bactéries présentant une activité amylasique, révélées par les zones de lyse sur amidon ont ainsi été isolées et identifiées (Annexe 7) . L'amylolyse a été confirmée par croissance sur milieu liquide avec de l'amidon soluble comme seule source de carbone. Parmi les souches étudiées, nous avons pu identifier trois Lactobacilles dont deux de l'espèce *L. plantarum* et 2 Entérobactériées (genre *Klebsiella* et *Enterobacter*). La mesure de l'activité alpha-amylasique des lactobacilles (phadebas test de chez Pharmacia) a mis en évidence une activité relativement importante sur deux souches, une première homofermentaire (*L. plantarum* notée A6, et une seconde hétérofermentaire notée A). Les résultats de l' étude physiologique de la souche A6, réalisée au LPMC de l'ORSTOM à Montpellier sont rapportés plus loin .

Parmi les souches lactiques isolées directement sur milieu MRS, deux souches ont pu être identifiées comme étant des *Lactobacillus plantarum*. Les autres bactéries n'ont pu être conservées lors du transfert des souches entre Brazzaville et Paris. La présence d'un lyophilisateur à la Faculté des Sciences de Brazzaville devrait permettre dans l'avenir une meilleure conservation des souches.

Par ailleurs, une étude des bactéries pectinolytiques entreprise au L.M. ORSTOM de Brazzaville a permis d'isoler une bactérie appartenant probablement au genre *Streptococcus* qui hydrolyse la pectine de citron en moins de 48 h. Cette bactérie présente la caractéristique d'être à la fois pectinolytique et amylolytique. Une étude plus détaillée de ses caractéristiques physiologiques est actuellement en cours au L.M.

Cette étude préliminaire microbiologique de la phase de rouissage a donc permis de mieux caractériser les populations bactériennes impliquées dans le rouissage des tubercules de manioc. Les bactéries lactiques du genre Lactobacilles semblent être la flore dominante du processus. A partir de ces dénombrements, une sélection des souches ayant des caractères amylolytiques et/ou pectinolytiques a permis d'isoler deux bactéries très performantes respectivement sur amidon et pectine. Ces souches sont actuellement en cours d'étude au L.M. de l'ORSTOM Brazzaville et au LPMC de Montpellier.

ANNEXE 1

Numération bacteriennes effectués au cours du rouissage

	temps	0		1		2		3		4		5		6	
		Num	log	num	log	num	log	num	log	num	log	num	log	num	log
Bact totales	BP1	ND	ND	2,1E+7	7,32	4,8E+7	7,68	1,3E+9	9,10	3,2E+8	8,51	2,80E+8	8,45	1,3E+8	8,10
	BP2	ND	ND	1,1E+7	7,04	4,0E+7	7,60	1,4E+9	9,15	3,0E+8	8,48	7,00E+7	7,85	1,6E+8	8,21
	BP3	ND	ND	1,4E+7	7,13	4,8E+7	7,68			1,2E+8	8,08				
	moy				7,16		7,65		9,13		8,35		8,15		8,16
Bact lactiques	BP1	4,0E+3	3,60	1,2E+8	8,07	7,0E+9	9,85	5,4E+9	9,73	1,6E+9	9,20	4,00E+8	8,60	2,0E+8	8,30
	BP2	4,0E+3	3,60	1,1E+8	8,03	2,4E+9	9,38	6,0E+9	9,78	2,2E+9	9,34	1,00E+9	9,00	3,0E+8	8,48
	BP3	4,0E+3	3,60	1,1E+8	8,05	1,8E+9	9,26	6,6E+9	9,82			6,00E+8	8,78	2,2E+8	8,34
	moy		3,60		8,05		9,49		9,78		9,27		8,79		8,37
Bact anaerobies (MPN a 3 tubes)	nd		8,0E+6	6,90	8,0E+6	6,90	1,0E+8	8,00	3,4E+10	10,54	2,3E+10	10,36	nd	nd	
Bact Amylo	BP1	6,2E+1	1,79			8,0E+6	6,90	nd		8,0E+7	7,90	1,20E+7	7,08	8,0E+6	6,90
	BP2	9,4E+1	1,97			2,0E+6	6,30			6,0E+7	7,78	8,00E+6	6,90	4,0E+6	6,60
	BP3	7,4E+1	1,87			2,0E+7	7,30			4,0E+7	7,60	3,00E+7	7,48		
	moy		1,88				6,84				7,76		7,15		6,75
Levures	temps	0		1		2		3		4		5		6	
		Num	log	Num	log	num	log	num	log	num	log	num	log	num	log
	BP1	<10		6,0E+0	0,78	4,0E+2	2,60	2,0E+3	3,30	1,2E+2	2,09	3,20E+3	3,51	3,4E+4	4,53
	BP2	<10		4,0E+0	0,60					2,0E+2	2,31	2,40E+3	3,38	2,6E+4	4,41
	BP3	<10		2,0E+0	0,30					1,4E+2	2,15			4,2E+4	4,62
moy				0,56		2,60				2,18		3,44		4,47	

5) Milieu pour bactéries amylolytiques

Milieu JP2 de composition suivante

Peptone M66	2,5g
Peptone de soja	5g
Peptone de caséine	2,5 g
Extrait de levure	5g
Extrait de viande	2,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1g
NaCl	3g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
K ₂ HPO ₄	0,2g
Amidon soluble prolabo	3 g
Tween 80	0,4 ml
Agar	15g

pH ajusté à 6,7 6,8 avant autoclavage, stérilisation à 110° pendant 30 mn

Mise en évidence du pouvoir amylolytique

La souche est repiquée sur boîte de pétri sur milieu JP2, puis incubé à 28°C, après 48 h de culture, la boîte est retournée sur des cristaux d'iode pendant 5 à 10 mn. L'activité amylolytique est mise alors en évidence par la présence d'un halo autour de la colonie.

6) Milieu pour bactérie pectinolytique

NaOH 1N	4,5 ml
CaCl ₂ H ₂ O 10 %	3 ml
NaNO ₃	1 g
YE	50 mg
Bacto Agar	1,5 g
Sodium polypectate	15 g

Agitation très forte au Waring (full speed) pendant 15 s dans 300 ml d'eau bouillante, on ajoute ensuite en remuant 200 ml d'eau bouillante. Avant de stériliser ajouter 1 ml de solution à 0,075 % de violet cristal

Stérilisation 20 mn à 120°. Couler immédiatement après car on ne peut faire fondre le milieu.

Sur ce milieu les colonies pectinolytiques créent une dépression profonde.

ANNEXE 2

COMPOSITION DES MILIEUX DE NUMERATION

1) Pour Bactérie totale

Milieu PCA (Plate count agar) Difco

2) Pour Bactéries lactiques

Milieu MRS Broth (milieu de Mann- Rogosa) liquide + 15 g d'agar/l ajusté à pH 5.5

3) Pour les levures

PDA (Potato dextrose agar) + 0,5 g de chloramphénicol

4) Bactéries anaérobies totales (BAT)

Solution de K_2HPO_4 à 6g/l	50ml
Solution minérale de belch	50ml
$NaHCO_3$	5g
H_2O QSP	1000 ml

pH ajuster après dégazage à 7,2

Stérilisation à 110 °, 30 mn

Ajout après stérilisation de

Na_2S (réducteur) : 0,5g
lactate : 30mM
Glucose : 2,5g/l
yeast extract et biotrypcase : 0,5g/l

Numération statistique (Most probable number) en milieu liquide , lecture de 3 tubes par dilution

Composition des milieux de croissance

Pour bactéries lactique

G-LAPTH G5 (pour un litre)

Autolysat de levure Difco	10 g
Peptone Evans	15g
Tryptone Difco	10g
Hepatex (extrait de foie)	5g
Si necessaire gélose	10g
Eau désionisée	1 l
pH 7,6 à 7,7	

Autoclaver 120° 20 mn

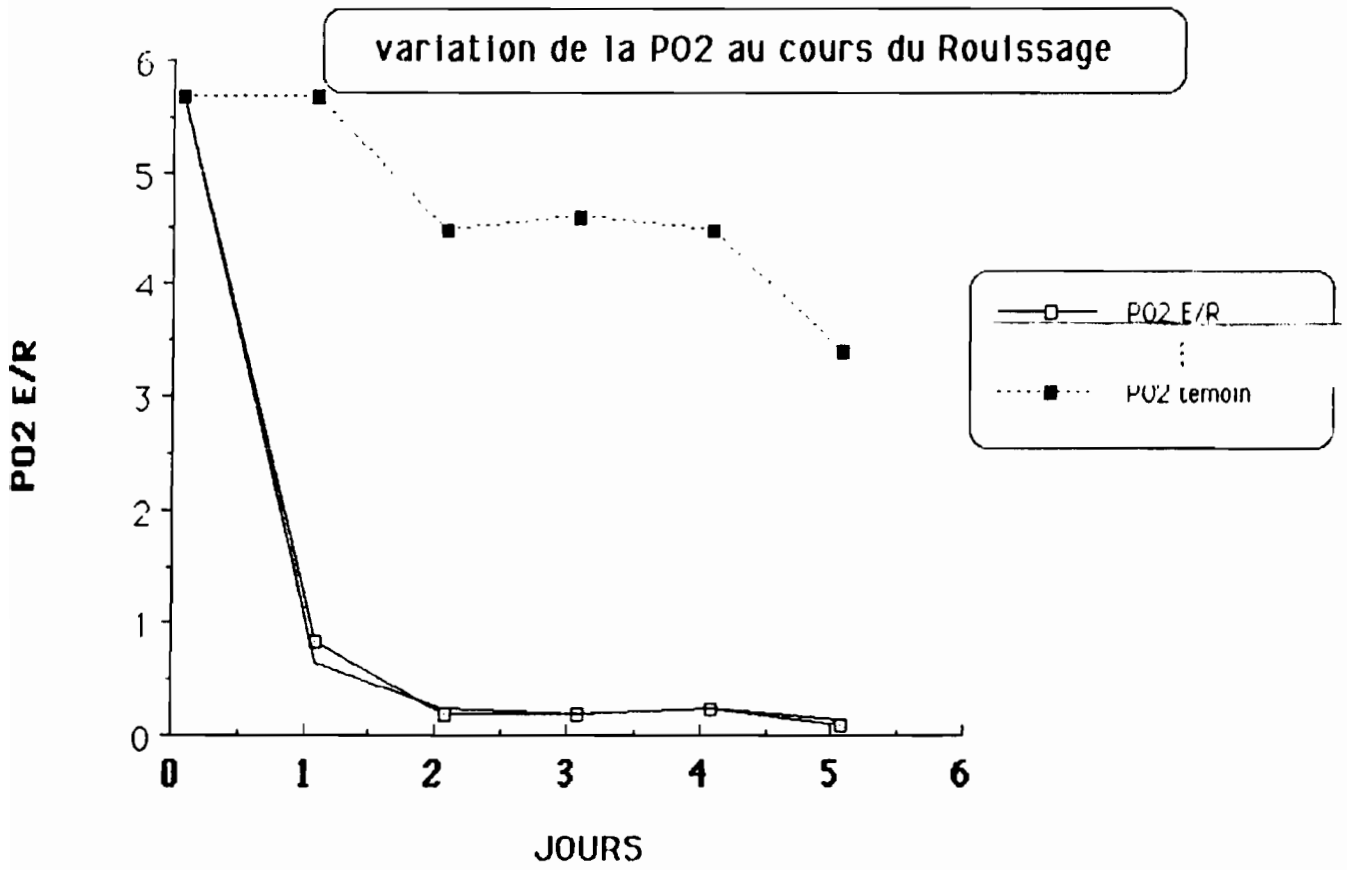
Filter sur Buchner avec hyplocel
ajouter glucose 5 g/l ou 10 g

Répartir en tubes(5 ou 9 ml) puis autoclaver 118°C, 20 mn

Pour bactéries lactiques amylolytiques

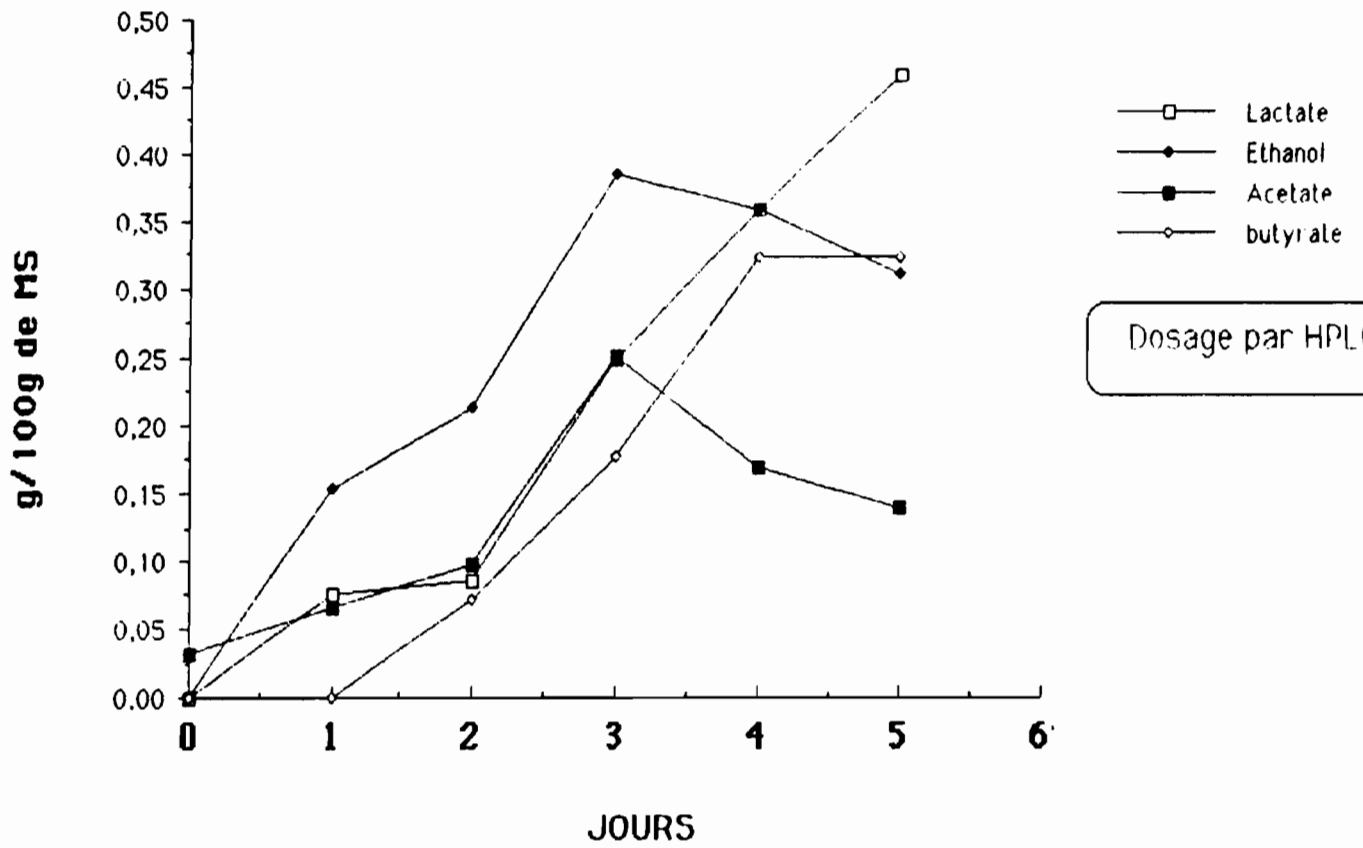
Même milieu que LAPTH mais on remplace le glucose par 3 g d'amidon soluble (Merck)

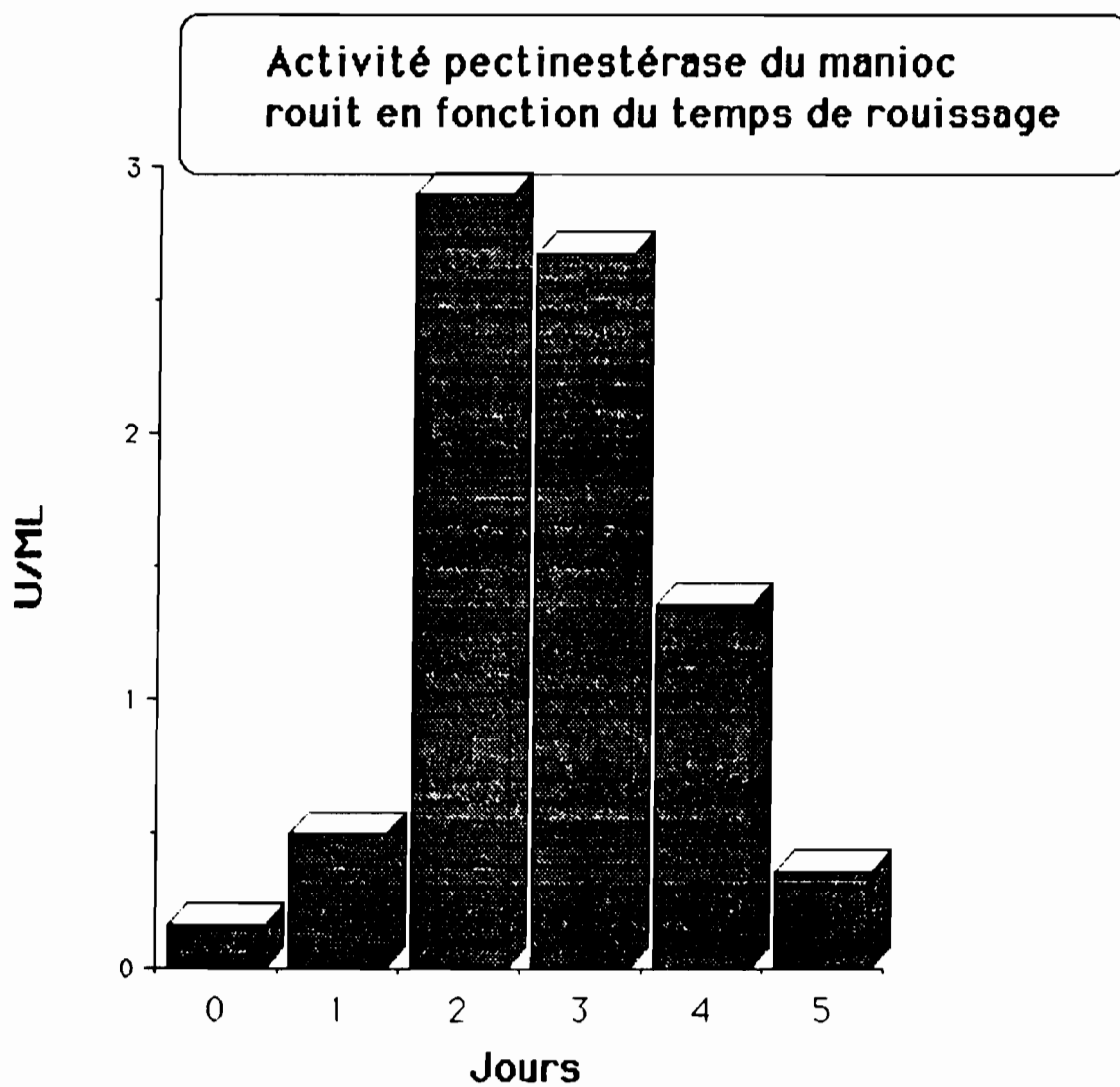
Annexe 4



Annexe 5

variation des Acides organiques
dans la racine de manioc au cours du rouissage





Annexe 7

Momenclature des bactéries lactiques amylolytiques isolées à partir de manioc en cours de rouissage

code	aspect macro	aspect micro	gram	Cat	gaz	alpha- amylase	croissance sur amidon	Identification api	Observation
A1	Colonie blanche muqueuse convexe, circulaire	Gros batonnet épais à bout arrondi à spores terminales	-	+	-	nd	+	genre klebsiella à confirmer	anaerobiefac
A'1	meme aspect que A1	meme aspect que A1	-	+	+	nd	+	genre Enterobacter	anaerobiefac
A5	colonie blanchâtre circulaire muqueuse	coques en tétrades entouré de mucus aspect pedicocques	nd	nd	nd	nd	+		pas de croissance après 2 repiquages
A6	Col beige muqueuse sur Amidon	Coccobacille présence de grands filaments	+	-	-	130 U/ml		L. plantarum	μatrophile
A''	Col beige muqueuse sur Amidon (LYPT80a)	gros batonnet épais à bout arrondi isolé ou en paire croiss sur MRS	+	-	+	185 U/ml		lactobacille	ana fac
43	colonie ronde circulaire blanchâtre, très bombée légèrement muqueuse sur MRS	petit bacille à bout arrondi	+	-	-	nd		L. Plantarum	croissance à 15 et 45 °

3- Etudes physiologiques des souches de *L plantarum* sélectionnées:

A la suite des études précédentes, *Lactobacillus plantarum* a été choisi comme modèle pour étudier les paramètres de culture et de production de starter.

3.1- Etude physiologique de *Lactobacillus plantarum* (souche *Lacto labo*):

a)- Cinétique de la croissance (figure 1): Nous avons pu mesurer un taux de croissance maximum de $0,57 \text{ h}^{-1}$, une concentration finale en biomasse de $9,5 \text{ g/l}$ avec un rendement global de près de 25% par rapport au glucose consommé ($Y_{x/s}=0,26$) ce qui représente une productivité très satisfaisante pour cette catégorie de microorganisme. Tous les paramètres de fermentation de cette souche sont rassemblés sur le tableau n°4.

b)- Nous avons par ailleurs étudié l'influence du pH et de la concentration en acide lactique dans le milieu de culture, car la croissance de cette bactérie s'accompagne d'une acidification très forte. Les résultats sont présentés sur les figures 2 et 3 ainsi que sur le tableau n°4.

A partir des résultats obtenus sur cette partie des travaux, un article a été rédigé en vue de sa publication dans *J. Fermentation & Biotechnol.*, intitulée "Mesure des paramètres de fermentation de *Lactobacillus plantarum* cultivé à différents pH et concentration initiales d'acide lactique".

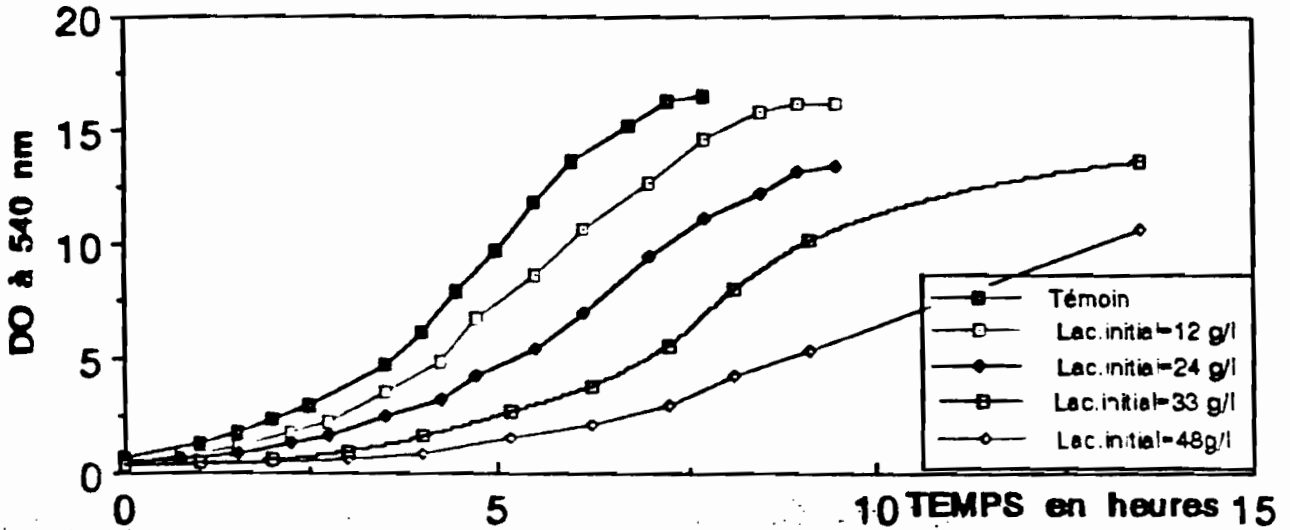
Les principaux résultats concernent non seulement les rendements de culture, mais également l'influence du pH et de l'acide lactique sur le taux de croissance, la concentration limite en acide lactique qui peut atteindre 140 g/l , ainsi que le découplage énergétique lorsque le milieu devient carencé en facteurs de croissance (phénomène non souhaitable dans le cas de production de biomasse, mais recherché dans le cas de production d'acide lactique).

c)- Une étude de caractérisation de physiologie de la biomasse et du métabolisme énergétique de *Lactobacillus plantarum* a été réalisée dans le but d'optimiser les rendements de culture de starters lactiques. Pour cela, une méthode de dosage du pool nucléotidique utilisant le dosage des différents nucléotides (ATP; ADP; AMP; NAD, NADP.....) a été mise au point et appliquée à la biomasse de cette bactérie dans deux états physiologiques bien caractérisés: en phase de croissance exponentielle et en phase de non prolifération avec un découplage énergétique de la transformation du glucose en acide lactique.

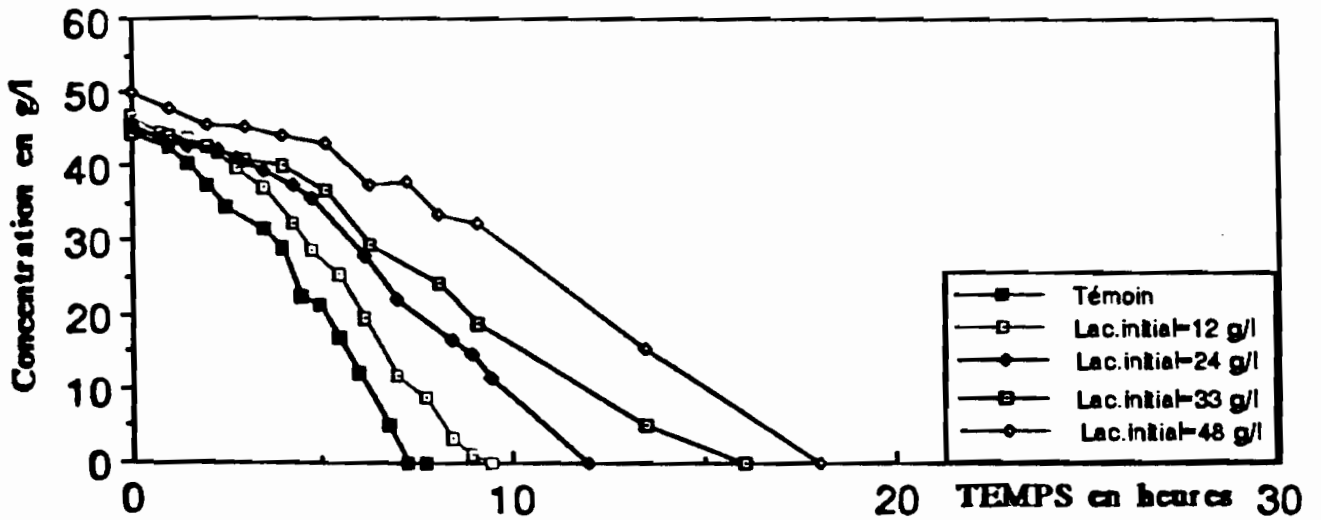
Figure 3.

**EFFET DU LACTATE SUR LA CROISSANCE DE
LACTOBACILLUS PLANTARUM
EN FERMENTEUR DE DEUX LITRES**

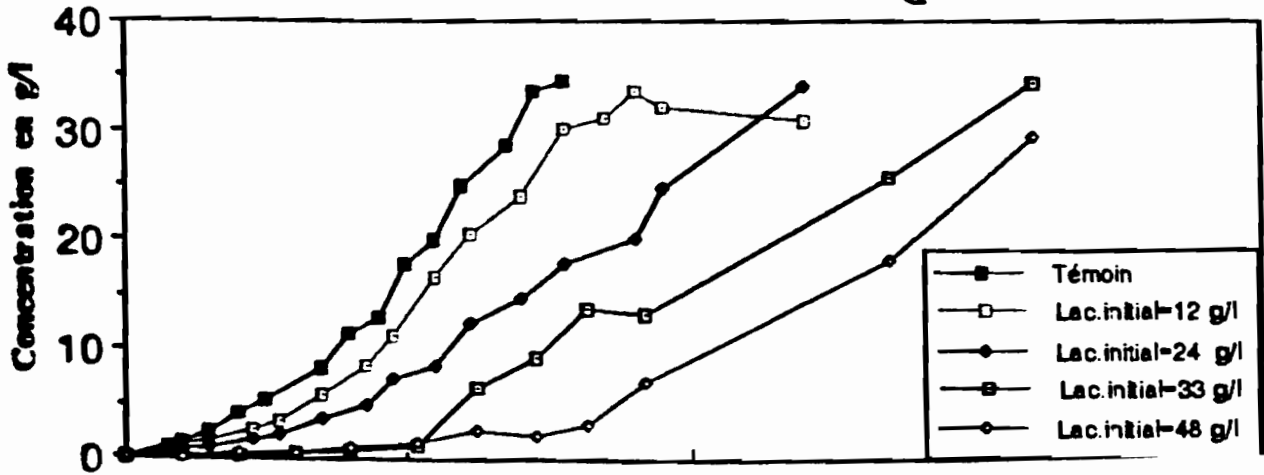
EVOLUTION DE LA DO



EVOLUTION DU GLUCOSE



EVOLUTION DE L'ACIDE LACTIQUE PRODUIT



A partir des résultats obtenus, un article a été rédigé et soumis à la revue *Biotechnology Techniques* concernant la méthodologie développée. Il est en effet très important de connaître les mécanismes impliqués dans le métabolisme énergétique pour optimiser les milieux et conditions de culture. Par exemple, en maîtrisant le pH, il est possible d'éviter ou de provoquer le découplage énergétique. Les résultats sont encourageants, mais demandent des investigations plus poussées qui sortent du cadre de cette étude. Toutefois, les enseignements obtenus nous permettent déjà de bien maîtriser la culture de cette bactérie lactique.

3.2 - Etude physiologique de la nouvelle souche amylolytique de *Lactobacillus plantarum* (souche ORSTOM A6):

Le manioc étant constitué essentiellement d'amidon (plus de 80% de la matière sèche) (Ketiku, 1970), la sélection d'une bactérie lactique capable de métaboliser l'amidon semble particulièrement importante. Il est à noter que la capacité des bactéries lactiques à fermenter l'amidon est une caractéristique assez peu commune (Sneath, 1986). Seules les souches du genre *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *Lactobacillus amylophilus*, *L. amylovorus* et *L. cellobiosus* isolées pour la plupart du tractus digestif des animaux ont été décrites (Cotta, 1988 ; Kmet, 1989). Les connaissances sur la physiologie de ces microorganismes sont pratiquement inexistantes. En effet, la majorité des travaux réalisés sur les bactéries lactiques ont porté jusqu'ici essentiellement sur la transformation du lactose, dans l'industrie laitière.

Isolement de la souche *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6. Elle a été isolée au Congo à partir d'échantillon de manioc roui après 4 jours de fermentation. Des échantillons de tubercules ont été homogénéisés (10g dans 90ml d'eau physiologique contenant 0.1% peptone) et 0.1 ml de différentes dilutions décimales ont été étalées sur boîte de Petri sur milieu JP2. Après incubation pendant 48h à 30°C, les boîtes sont exposées à des vapeurs d'iode pour mettre en évidence les zones d'hydrolyse de l'amidon. Les souches sélectionnées pour leur caractère amylolytique sont repiquées sur JP2 et conservées à 4°C. La production d'acide lactique est mise en évidence par analyse par HPLC du surnageant de culture des différentes souches sur milieu MRS contenant 20g/l d'amidon. Les souches sélectionnées pour leur caractère lactique et amylolytique sont alors identifiées au moyen d'un test commercialisé API 50CH (# 5030) (Biomerieux, France), basé sur la détermination de l'aptitude des souches à fermenter 39 sucres différents.

Sélection de *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 :

Sept microorganismes amylolytiques ont pu être isolés sur milieu JP2 à partir de tubercules de manioc roui pendant 4 jours de fermentation. Parmi les 7 souches, 2 ont été sélectionnées pour leur capacité à produire de l'acide lactique à partir de l'amidon (mise en évidence par HPLC). Elles ont pu être identifiées grâce aux résultats des tests API (Tab. 1) comme des souches de *Lactobacillus plantarum* avec une probabilité de 99,9 %. Les 2 souches, ORSTOM A6 et ORSTOM A43 présentant le même profil de dégradation des sucres sont probablement identiques. La souche ORSTOM A6 dénommée par la suite *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 a été sélectionnée pour la suite de notre étude.

Nous pouvons remarquer à partir de la figure n° 1, une activité amylolytique très importante de cette souche, bien supérieure à celle de 2 autres souches lactiques amylolytiques de *Streptococcus equinus* CNCM 103233 et *Lactobacillus amylophilus* CNCM102988T utilisées comme référence .

Caractérisation du type d'enzyme amylolytique produite :

Afin de caractériser l'activité amylolytique synthétisée par ce *L. plantarum* , nous avons comparé les profils chromatographiques d'HPLC des produits de la réaction obtenus après action sur l'amidon de l'extrait accélélaire avec des enzymes amylolytiques commercialisées (alpha-amylase d'*Asprgillus niger*, Sigma A3514 ; Beta-amylase de pomme de terre , Sigma A7005 et amyloglucosidase d'*Aspergillus oryzae* Sigma A0273). Dans ces conditions, nous pouvons observer (fig 2) pour l'amyloglucosidase l'apparition essentiellement d'un pic de glucose, pour la Beta-amylase d'un pic de maltose et pour l'Alpha-amylase d'un pic non identifié à 5,17 min correspondant à un oligosaccharide, d'un pic de maltose et de glucose. Le profil obtenu par l'action de l'enzyme produite par *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 se superpose parfaitement avec celui de l'Alpha-amylase.

L'enzyme synthétisée par notre souche peut donc être assimilée à une alpha-amylase, elle est extra cellulaire puisqu'elle est mesurée dans le surnageant acellulaire.

Cinétique de croissance de *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 :

Cette étude a été réalisée sur différents milieux de culture. Les figures 3, 4 et 5 représentent respectivement les cinétiques de croissance de *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 sur MRS glucose 50 g/l, MRS amidon 50 g/l et MRS glucose 20 g/l + amidon 30 g/l. Les principaux paramètres de fermentation obtenus sont présentés dans le tableau 2.

Nous notons que la croissance de *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 sur milieu MRS glucose est tout à fait comparable à celle de *Lactobacillus plantarum* (Lacto Labo), figure 6. Le taux de croissance de 0,43 h⁻¹ et la productivité de 0,75 g/l/h sont légèrement

plus faibles que ceux obtenus pour la souche de Lacto Labo, mais les rendements en biomasse et en lactate sont sensiblement identiques. La souche ne semble pas présenter ainsi d'exigences nutritionnelles spécifiques différentes de celles de Lacto Labo. Ces premiers résultats permettent de penser que la production massive de *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 ne devrait pas poser plus de problèmes que celle de *Lactobacillus plantarum* Lacto labo .

Sur MRS amidon, la souche conserve les mêmes profils cinétiques et les mêmes rendements. La quantité d'enzyme synthétisée à la fin de la fermentation est de 3300 U.I. par litre, près de 50% de l'enzyme est synthétisé pendant la phase de ralentissement de la croissance. La vitesse d'hydrolyse de l'amidon est supérieure à sa vitesse d'assimilation ce qui conduit à l'apparition d'un pic de maltose de 3 g/l à la septième heure de fermentation (résultat non montré). L'hydrolyse de l'amidon n'est donc pas un facteur limitant pour la croissance du microorganisme.

Sur MRS amidon + glucose, la synthèse d'alpha-amylase intervient juste avant épuisement du glucose dans le milieu . Un seuil de répression de la synthèse de l'enzyme par le glucose de 5 g/l peut être estimé, en dessous de ce seuil critique, la production d'enzymes est alors très rapide. Nous n'observons pratiquement pas de ralentissement de la croissance lors du changement de métabolisme nécessaire à l'assimilation de ces deux substrats. La quantité d'enzyme produite à la fin de la fermentation est de 4300 U.I. par litre, concentration sensiblement supérieure à celle obtenue sur MRS amidon.

Propriétés de l'alpha-amylase :

Effet du pH sur l'activité enzymatique : L'activité enzymatique a été testée dans une gamme de pH entre 2,5 et 8 , figure 5. L'activité maximale de l'enzyme est observée à pH=5 ; 70% de l'activité est encore retrouvée à pH 4, alors qu'à pH 2,5 et 8 l'enzyme est pratiquement inactivée.

Effet de la température sur l'activité enzymatique :L'influence de la température sur l'activité alpha-amylase testé dans une gamme de température de 10 à 80°C, est présentée figure 6. Dans les conditions étudiées, la température optimale pour l'alpha-amylase est de 55°C, l'activité est encore de 60% à 30°C.

Conclusion:

Nous avons pu mettre en évidence que chez *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 , l'activité amylasique est nettement supérieure à celle de *Streptococcus equinus* ou de

Lactobacillus amylophilus. L'enzyme synthétisée a pu être identifiée à une alpha-amylase, par comparaison des analyses par HPLC des produits de la réaction obtenus après action sur l'amidon d'enzymes amylolytiques commercialisées. Une étape supplémentaire de purification reste cependant nécessaire afin de déterminer si cette activité est le résultat d'une ou plusieurs enzymes. L'enzyme synthétisée présente des propriétés très intéressantes, elle est extra cellulaire et conserve près de 70% d'activité à pH acide (pH 4 - 4,5), condition retrouvée dans le manioc à partir du troisième jour de rouissage (OKAFOR, 1984). Ces caractéristiques sont donc différentes de celles trouvées sur un microorganisme appartenant au genre *Leuconostoc* isolé par Lingren (1984) où l'enzyme est liée à la cellule et inactive à pH inférieur à 4,5, c'est également le cas de *Lactobacillus cellobiosus* dont l'enzyme est extra cellulaire mais inactive à pH acide (Sen, 1987).

La souche décrite a un taux de croissance très élevé $0,43 \text{ h}^{-1}$ et un rendement en biomasse $Y_{x/s}$ important (0,19 g/g) tout à fait comparable à une souche industrielle de *Lactobacillus plantarum* (Lacto labo). la production massive de cette bactérie peut ainsi être envisagée pour fournir

un starter pour la bioconversion des aliments amylicés, non seulement pour améliorer la fabrication des aliments fermentés à base de manioc mais également pour améliorer la digestibilité de bouillies et farines alimentaires. Néanmoins, des études complémentaires s'imposent afin de déterminer les améliorations réelles que peut apporter l'inoculation en masse de tubercules de manioc par *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 sur la qualité des aliments obtenus.

Sur amidon, la croissance est similaire à celle sur glucose, la vitesse de production de l'enzyme permettant de maintenir un taux de croissance maximal. Le rendement de conversion de l'amidon en acide lactique, $Y_{p/s}$, est de 79%. L'utilisation de *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 peut être ainsi également envisagée pour la production industrielle d'acide lactique à partir de résidus d'amidon.

sucre	<i>L.plantarum</i> ssp *	<i>L.plantarum</i> (Lacto Labo)	ORSTOM A6	ORSTOM A43
Control	0			
Glycérol	22			
Erythritol	0			
D-Arabinose	0			
L-Arabinose	69	+	+	+
Ribose	100	+	+	+
D-Xylose	13			
L-Xylose	0			
Adonitol	0			
Methyl-xuloside	0			
Galactose	93	+	+	+
D-Glucose	100	+	+	+
D-Fructose	100	+	+	+
D-Manose	100	+	+	+
L-Sorbose	2			
Rhamnose	27			
Dulcitol	0			
Inositol	0			
Manitol	97	+	+	+
Sorbitol	73	+		
Methyl-D-mannoside	52		+	+
Methyl-D-glucoside	38			
N Acetyl glucosamine	100	+	+	+
Amygdaline	97	+	+	+
Arbutine	100	+	+	+
Esculine	100	+	+	+
Salicine	97	+	+	+
Cellobiose	97	+	+	+
Maltose	100	+	+	+
Lactose	97	+	+	+
Meliobiose	88	+	+	+
Saccharose	80	+	+	+
Trehalose	88	+	+	+
Isuline	0			
Melezitose	80	+	+	+
D-Raffinose	72	+	+	+
Amidon	8		+	+
Glycogène	8		+	+
Xylitol	0			
Gentobiose	94	+	+	+
D-Turanose	61			
D-Lyxose	2			
D-Tagatose	5			
D-Fucose	0			
L-Fucose	0			
D-Arabitol	33			
L-Arabitol	0			
Gluconate	66		+	+
2 Ceto-gluconate	0			
5 Ceto-gluconate	0			

Tableau 1 : Identification des souches par le métabolisme des sucres.

* % de réaction positives après 48 h à 37°C

SOUCHE	MILIEU	μ h^{-1}	Tg h	Yx/s $g \cdot g^{-1}$	Yp/s $g \cdot g^{-1}$	Y ATP $g \cdot mole^{-1}$	Productivité $g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$	Yx/s + Yp/s $g \cdot g^{-1}$
<i>L.plantarum</i> Lactolabo	M.R.S glucose 50 g/L	$0,57 \pm 0,03$	$1,21 \pm 0,08$	$0,22 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,04$	$19,8 \pm 2,6$	1,05	$0,97 \pm 0,07$
<i>L.plantarum</i> ORSTOM A6	M.R.S glucose 50 g/l	$0,43 \pm 0,03$	$1,61 \pm 0,08$	$0,19 \pm 0,02$	$0,81 \pm 0,1$	$17,1 \pm 1,8$	0,78	$1 \pm 0,12$
<i>L.plantarum</i> ORSTOM A6	M.R.S amidon 50 g/l	$0,45 \pm 0,03$	$1,54 \pm 0,08$	$0,23 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,1$	$20,7 \pm 2,6$	0,63	$0,98 \pm 0,13$
<i>L.plantarum</i> ORSTOM A6	M.R.S glucose 20 g/l +amidon 30 g/l	$0,41 \pm 0,06$	$1,69 \pm 0,09$	$0,19 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,06$	$17,1 \pm 1,8$	0,71	$0,93 \pm 0,08$

Tableau n°2 . Paramètres de fermentation de *Lactobacillus plantarum* et de *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 cultivés sur différents milieux à pH 6, $\theta=30^{\circ}C$.

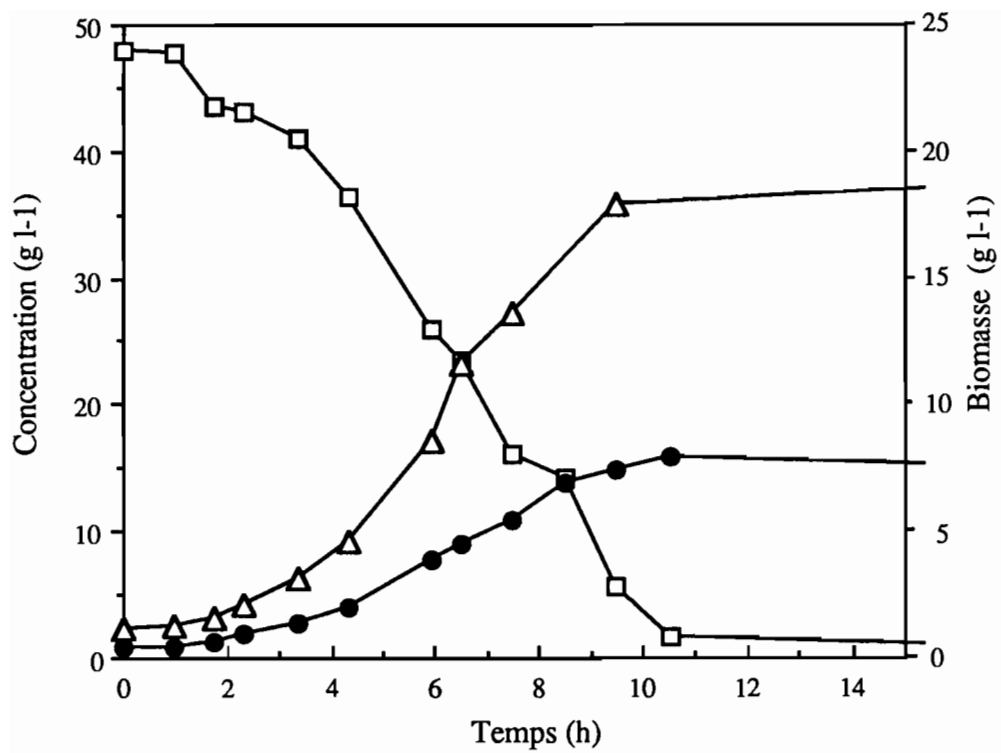


Fig 1: Cinétique de croissance de *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 sur MRS glucose. (Glucose: □ ; Lactique: △ ; Biomasse: ●).
Température 30°C; pH 6.

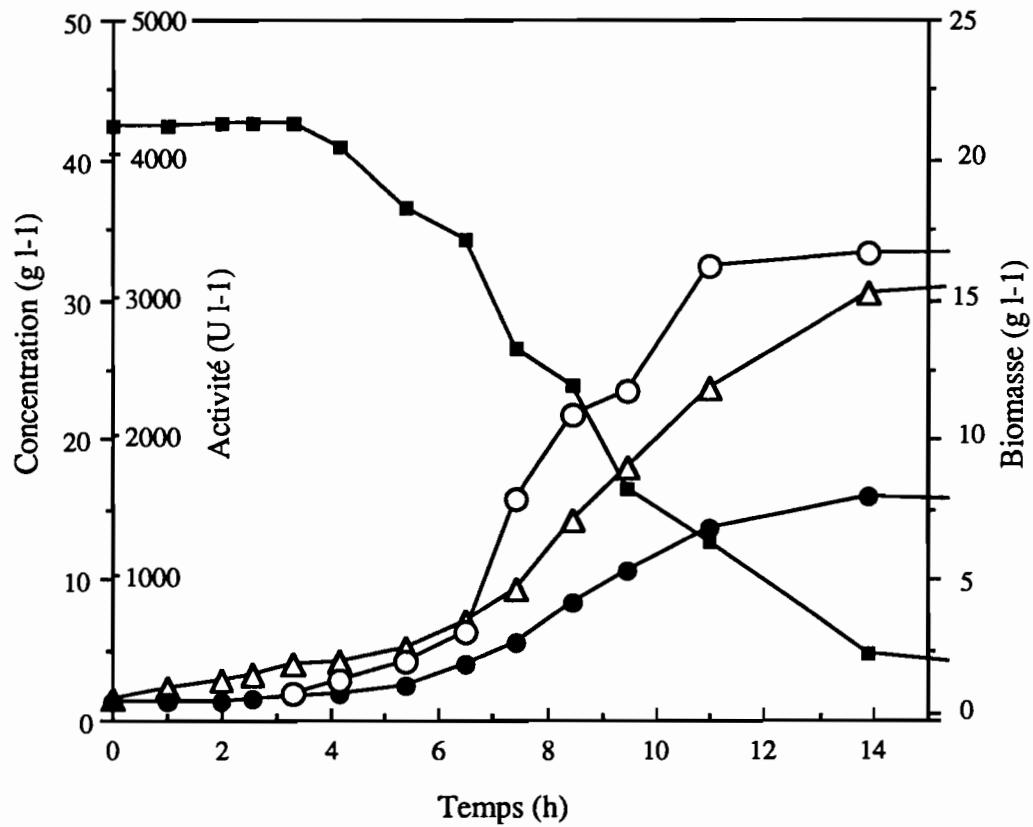


Fig 2: Cinétique de croissance de *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 sur MRS amidon. (Amidon: ■ ; Lactique: Δ ; Biomasse: ● ; Activité: ○).
Température 30°C; pH 6.

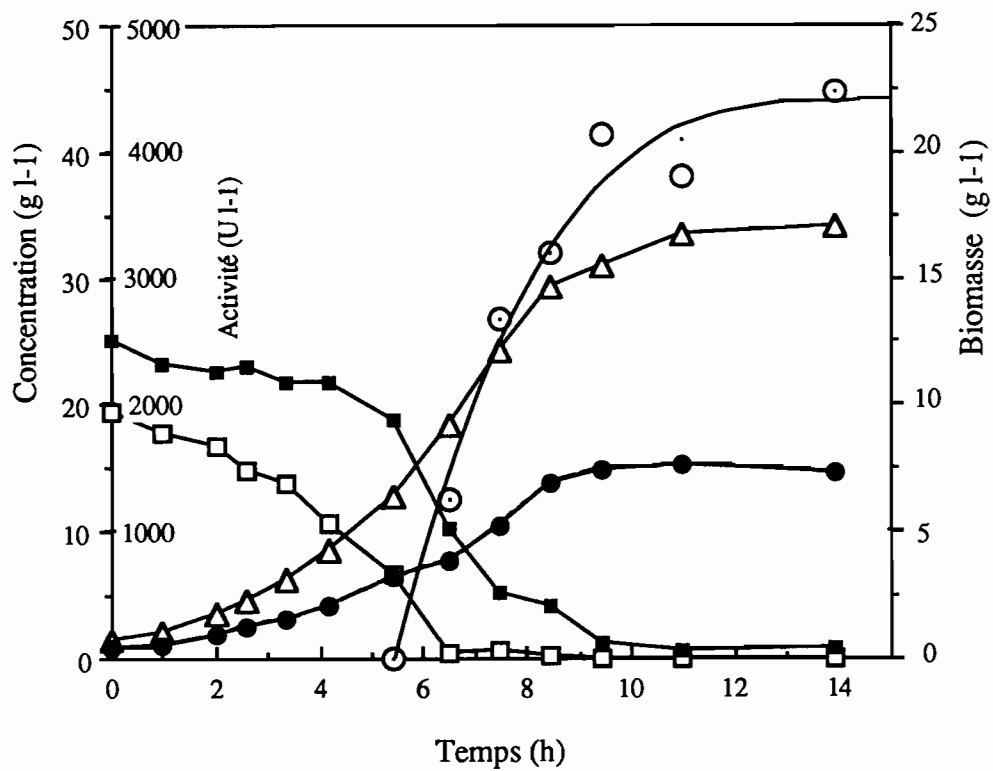


Fig 3: Cinétique de croissance de *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6 sur MRS glucose + amidon. (Glucose: □ ; Amidon: ■ ; Lactique: △ ; Biomasse: ● ; Activité: ○). Température 30°C; pH 6.

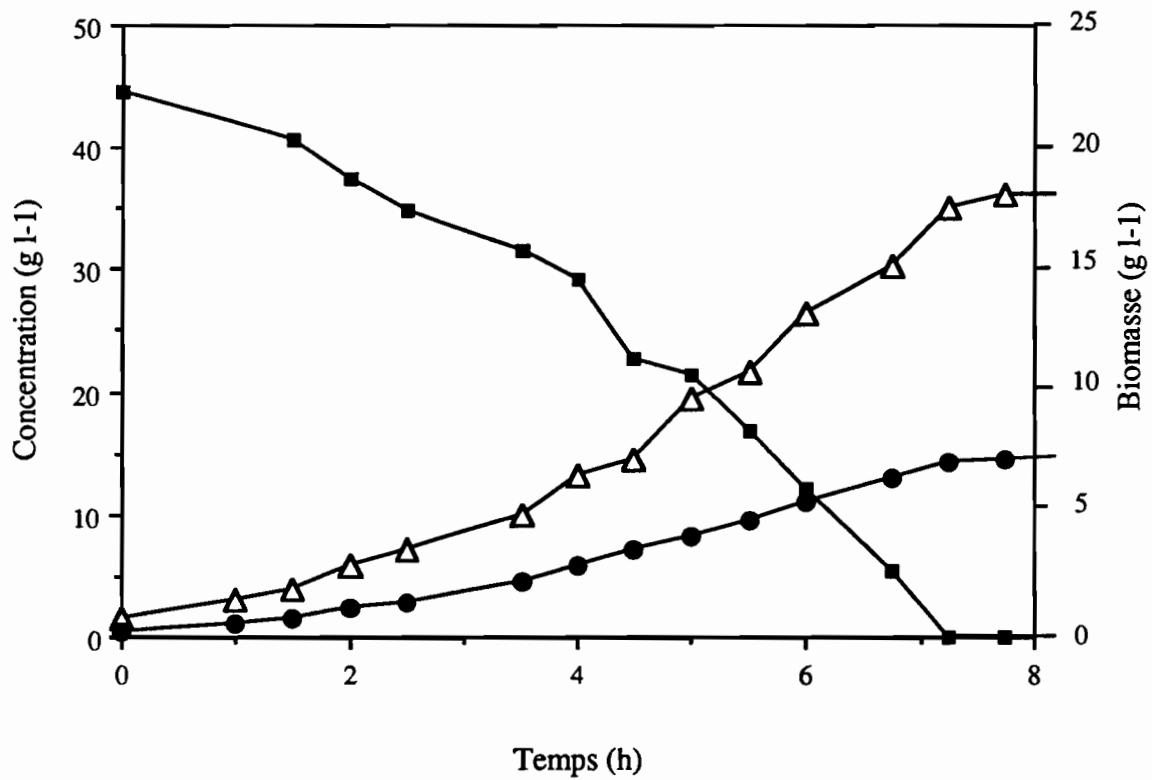


Fig 4: Cinétique de croissance de *Lactobacillus plantarum* Lacto Labo sur MRS glucose. (Glucose: □ ; Lactique: Δ ; Biomasse: ●).
Température 30°C; pH 6.

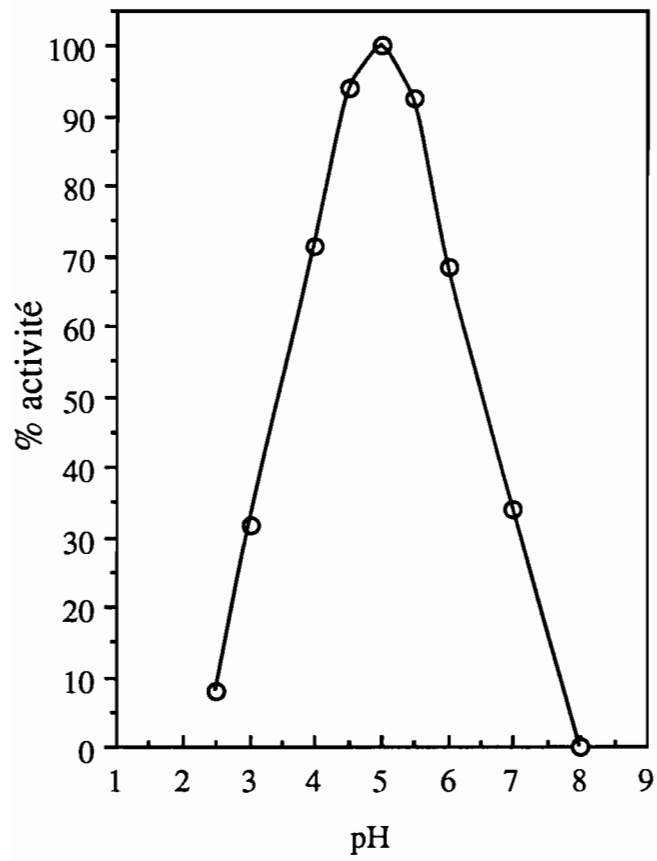


Fig 5 : Effet du pH sur l'activité de l' alpha-amylase de *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6, (T=40°C)

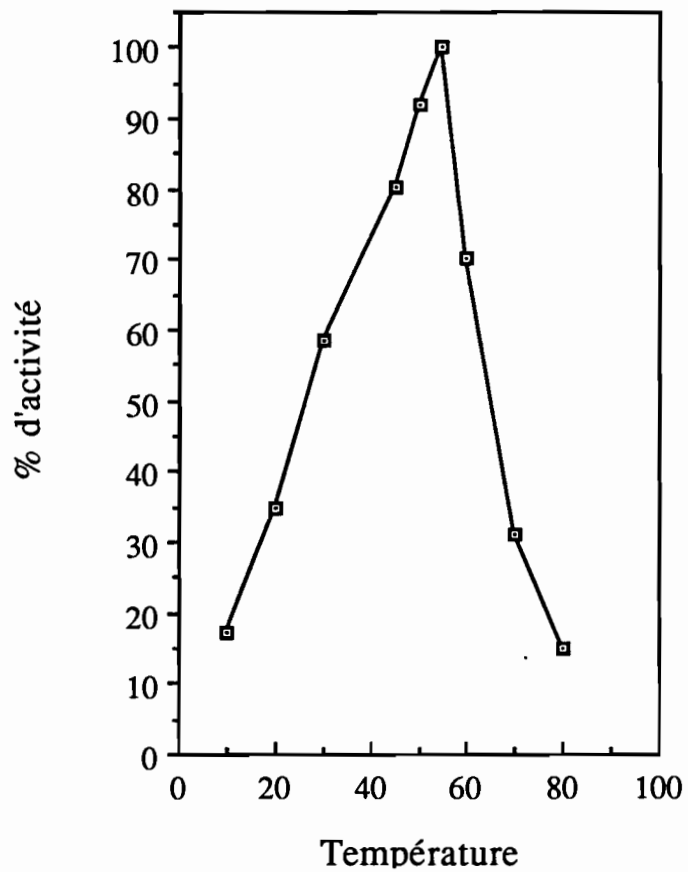


Fig 6 : Effet de la température sur l'activité de l'alpha-amylase de *Lactobacillus plantarum* ORSTOM A6, (à pH 6).

4. Résistance des bactéries lactiques au cyanure.

Lors de la fermentation du manioc, on observe une dégradation de composés cyanogénétiques (linamarase) qui conduit à l'accumulation de concentrations variables en cyanures libres dans le milieu de fermentation, celles-ci pouvant atteindre parfois 100 ppm.

L'effet très toxique du cyanure sur les microorganismes aérobies ou possédant une chaîne respiratoire est connu depuis très longtemps . Une étude préliminaire a été réalisée afin de déterminer la sensibilité des bactéries lactiques (Microorganismes aéro tolérants , dépourvus de chaîne respiratoire) à des concentrations de cyanures allant de 0 à 1000 ppm.

4 souches ont été étudiées : *Lactobacillus plantarum* A6, *Lactobacillus plantarum* (lacto labo), *Streptococcus lactis* et *Leuconostoc mesenteroides* . Les souches ont été cultivées à 30°C, sur milieu MRS contenant différentes concentrations de cyanure (0 ; 0,1 ; 0,3 ; 0,5 ; 1 g/l de CN⁻. Le pH du milieu a été ajusté à 6,4 après ajout du cyanure stérilisé par filtration). Après 48 heures d'incubation , on a mesuré la D.O à 540nm ainsi que la quantité d'acide lactique produite:

	CN- [g/l]	<i>L. plantarum</i> Lacto Labo	<i>L. plantarum</i> A6	<i>L.mesenteroides</i>	<i>S.lactis</i>
Unités D.O	0	5,7	6,4	2,48	1,1
	0,1	5,1	5,88	1,74	0,82
	0,3	4,46	4,18	1,28	0,61
	0,5	3,34	1,64	0,2	0,54
	1	0,282	0,05	0,01	0,11
Acide lactique produit	0	16,35	16,13	9,12	7,31
	0,1	14,37	15,36	8,81	6,68
	0,3	14,6	14,64	1,2	5,63
	0,5	13,91	9,04	1,18	4,95
	1	7,31	1,28	0,42	0,3

Effet de la concentration en cyanure sur la croissance de différentes souches de bactéries lactiques.

Nous pouvons ainsi observer que les quatre souches testées sont capable de pousser jusqu'à une concentration de CN- de 500ppm. Il est peut être utile de rappeler que la dose mortelle pour l'homme est de 50 à 60 ppm et que la dose toxique pour les microorganismes aérobies ne dépasse pas quelques ppm.

Pour une concentration de 1000 ppm la souche *Lactobacillus plantarum* (lacto labo) présente même une faible croissance . Nous pouvons donc ainsi penser que les bactéries lactiques en général résistent à des quantité relativement élevée de cyanure jusqu'à une concentration de 500ppm (Quantité maximale rencontré dans les variétés de manioc les plus amers). Nous observons cependant un effet inhibiteur du cyanure sur la croissance ainsi que sur la production d'acide produite chez ces bactéries lactiques . Des études complémentaires seraient nécessaires afin de préciser à quel niveau du métabolisme le cyanure exerce son effet toxique .

Il est toutefois important de souligner que les bactéries lactiques sont des germes très compétitifs et bien adaptés aux milieux à base de manioc.

5. Mise en évidence d'une activité bêta-glucosidase et d'une linamarase chez les Bactéries lactiques

La capacité de certaines bactéries lactiques à hydrolyser des beta glucoside (cellobiose, PNPG...) est assez bien connue. La linamarine étant un beta-glucoside , il nous a paru intéressant de déterminer si certaines bactéries lactiques sont également capable d'hydrolyser la linamarine .

Les 4 mêmes souches ont été étudiées : *Lactobacillus plantarum* A6, *Lactobacillus plantarum*(lacto labo), *Streptococcus lactis* et *Leuconostoc mesenteroides* . Les souches ont été cultivées à 30°C en tube contenant 10ml de milieu MRS avec comme seule source de carbone soit du PNPG (p- Nitrophenylglucopyranoside) soit du cellobiose à une concentration de 2g/l . Après 48 heures de culture, nous avons mesuré par HPLC la quantité d'acide lactique produit, le PNPG résiduel ainsi que la DO à 420nm (maximum d'absorption du PNP) du surnageant .

	Croissance	DO à 420nm du SN	Lactique (HPLC)	PNPG résiduel (HPLC)
<i>Lacto plantarum</i>	+	3,28	1,49	0
<i>ORSTOM A6</i>	+	3,69	1,47	0
<i>Leuco Cremoris</i>	±	0	0,32	++
<i>Leuco mesenter</i>	+	4,5	1,16	+
<i>Strepto. lactis</i>	+	2,17	0,32	+

Croissance sur Milieu MRS + 2 g/l de PNPG

a) Mise en évidence d'une activité beta-glucosidase

-Dans le surnageant : dans 200µl de tampon acetate 0,1M pH =5,5 contenant 0,1M de PNPG , on a ajouté 200µl de surnageant . Le mélange réactionnel est mis alors à incuber à 30°C . L'activité beta-glucosidase est mise en évidence par l'apparition du PNP qui développe une couleur jaune, et par l'apparition de glucose.

Dans le surnageant : Pas d'activité

- Dans le culot (*resting cells*) : Le culot récupéré après centrifugation de 10ml de milieu de culture est lavé 2 fois avec de l'eau puis mis à incuber avec 400µl de tampon acétate contenant 0.1M de PNPG . L'activité beta glucosidase est mis en évidence comme précédemment .

	PNP (après 2h)	CN-	Glucose
Lacto planta	+++	0	-
A6	+++	0	-
Leuco Cremoris	-	0	-
Leuco mesen	+	0	+(17h)
Strepto lactis	+	0	++ (17h)

Activité PNPGase dans les cellules

b) Mise en évidence d'une activité Linamarase

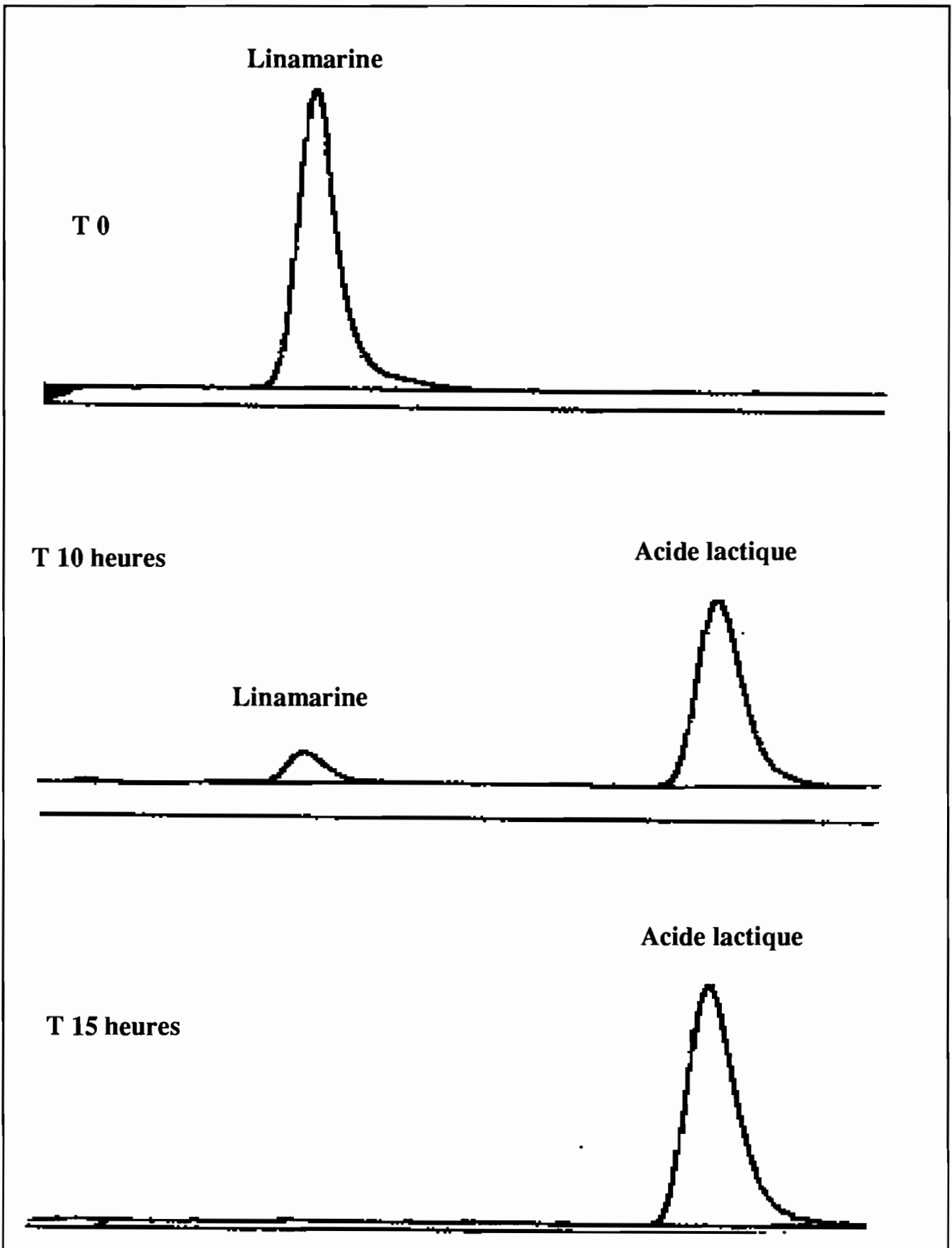
-Dans le surnageant : dans 300µl de tampon acetate 0,1M ph 5,5 , on a ajouté 100µl de surnageant et 100 µl de tampon acetate contenat 0.1M de linamarine. Le mélange réactionnel est mis alors à incuber à 30°C . L'activité linamarase est mise alors en évidence par l'apparition de cyanure dosé par un kit, et par l'apparition de glucose:

Dans le surnageant : Pas d'activité

-Dans le culot (*resting cells*): Le culot récupéré après centrifugation de 10 ml de milieu de culture est lavé 2 fois avec de l'eau puis mis à incuber avec 400µl de tampon acétate et 200µl de tampon acétate contenant 0.1M de linamarine . L'activité linamarase est mis en évidence comme précédemment:

	PNP	CN- (2h) ppm	CN- (17h) ppm	Glucose
Lacto planta	0	12	300	-
ORSTOM A6	0	80	300	-
Leuco Cremoris	0	0	0	-
Leuco mesen	0	1,8	4,2	-
Strepto lactis	0	8	18	-

Activité Linamarasease dans les cellules



Mise en évidence par HPLC de la transformation de la linamarine en acide lactique par *Lactobacillus plantarum* A6. (cellules dans un tampon phosphate)

Le diagramme ci-joint montre par ailleurs les résultats des analyses HPLC des échantillons des suspensions cellulaires de *Lactobacillus plantarum* A6 en présence de linamarine après 0, 10 et 15 heures d'incubation. Ces analyses démontrent bien que cette bactérie est capable de transformer la linamarine en acide lactique, et que ceci est corrélé à l'apparition de CN- libres dans la suspension.

Il ressort donc de cette expérience que les cellules de *Lactobacillus plantarum* A6 cultivées sur PNPG possèdent une bêta-glucosidase capable d'hydrolyser la linamarine en glucose et cyanure libre, et de transformer le glucose formé en acide lactique.

En conclusion de cette étude préliminaire, mais très importante, on notera que parmi les 5 souches testées, 4 ont une activité bêta-glucosidase et linamarase . D'après ce premier résultat, il semblerait donc que la capacité des bactéries lactiques à hydrolyser la linamarine soit une caractéristique assez commune, mais les souches de *Lactobacillus plantarum* semblent présenter la plus forte activité enzymatique .

Ces études sont actuellement poursuivies au LPMC de l'ORSTOM à Montpellier pour confirmer ces résultats préliminaires. C'est en effet la première fois que l'on démontre une activité directe des bactéries lactiques sur la dégradation de la linamarine, et nous pensons pouvoir publier rapidement ces résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] REGEZ P.F., ZORZI N., NGOY K. & BALIMANDAWA M._ Evaluation de l'importance de quelques souches de *Lactobacillus* sp. pour l'acidification de différents aliments à base de manioc
in : Lebensm.Wiss.U.Technol, 1988, **21**,288-291.
- [2] DE LABBEY B._ Fermentation au cours du rouissage du manioc au Congo
in : Diplôme d'Etudes Approfondies, Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation, 1989, 37p .
- [3] REGEZ P.F., IFEBE A. & MUTINSUMU M.N._ Microflora of traditional cassava foods during processing and storage : the cassava bread (chikwangu) of Zaire
in : Microbiologie - Aliments - Nutrition, 1987, **5**, 303-311.
- [4] EBENZER R.V._ Fermented milks
in : Economic Microbiology, Vol 7, Fermented Foods. Edited by : ROSE A.H . Academic Pres, 1982, 199-225.
- [5] SEALE D.R._ Bacterial inoculants as silage additives
in:Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement,1986, **61(15)**, 9S-26S.
- [6] DEVOYOD J.J. & POULLAIN F._ Les Leuconostocs, Propriétés : leur rôle en biotechnologie laitière
in : Le Lait, 1988, **68(3)**, 249-280 .
- [7] CHAIBI A., LARPENT J.P. & VOILLEY A .._ Fabrication du Lben marocain en utilisant des Streptocoques lactiques sélectionnés
in : Microbiologie-Aliments-Nutrition, 1989, **7**, 43-48.
- [8] MARSHALL V.M._ Lactic acid bacteria : starters for flavours
in : FEMS Microbiology Reviews, 1987, **46**, 327-336 .
- [9] MUCHNIK J. & VINCK D._ La transformation du manioc, technologies autochtones
in : Presses universitaires de France, Collection Technique Vivantes, Paris .
- [10] HENDERSON A.R. & Mc DONALD P._ The effect of a range of commercial inoculants on the biochemical changes during the ensilage of grass in laboratory studies
in : Res. Devel. Agric, 1984, **1(3)**, 167-171 .
- [11] WEINBERG Z.G., ASHBELL.G. & AZRIELI A._ The effect of applying lactic bacteria at ensilage on the chemical and the microbiological composition of vetch, wheat and alfalfa silages
in : Journal of Applied Bacteriology, 1988, **64**, 1-7.

- [12] ROOKE J.A., BELL S.L. & ARMSTRONG D.G._ The chemical composition of grass silages prepared with and without pre-treatment with inoculants containing *Lactobacillus plantarum*
in : Animal feed science and technology, 1985, **13**, 269-279.
- [13] WEINBERG Z., ASHBELL G. & LISKER N._ The effect of addition of lactic acid bacteria inoculum to wheat and corn silages in Israel
in : Agronomie, 1987, **7(9)**, 709-713.
- [14] WHITTENBURY R._ An investigation of the lactic acid bacteria
in : Ph D thesis , 1961, University of Edinburgh.U.K.
- [15] COGAN T.M._ Les levains lactiques mésophile. Une revue
in : Le Lait, 1980, **60**, 397-425.
- [16] BUCHANAM R.E. & GIBBONS N.E._ The genus *Lactobacillus*
in : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology VIII^o edition, 576-592
Ed: COWAN S.T., HOLT J.G., LISTON J., MURRAY R.G.E., NIVEN C.F., RAVIN A.W. & STANIER R.Y. The Williams and Wilkins Company/Baltimore .
- [17] BUCHANAM R.E. & GIBBONS N.E._ The family *Streptococcaceae*
in : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology VIII^o edition, 490-515
Ed: COWAN S.T., HOLT J.G., LISTON J., MURRAY R.G.E., NIVEN C.F., RAVIN A.W. & STANIER R.Y. The Williams and Wilkins Company/Baltimore .
- [18] TANIGUCHI M., KOTANI.N. & KOBAYASHI T._ High concentration cultivation of lactic acid bacteria in fermentor with cross-flow filtration
in : J. Ferment. Technol, 1987, **65(2)**, 179-184.
- [19] BARRETO M.T.O., MELO E.P. & CARRONDO M.J.T .._ Starter culture production in fluidized bed reactor with a flocculent strain of *L.plantarum*
in : Biotechnology Letters, 1989, **11(5)**, 337-342.
- [20] GIRAUD E._ Dosage des acides gras volatils, amidon, glucose, éthanol par H.P.L.C.
in : Rapport interne O.R.S.T.O.M.
- [21] KEMP T.L., KARIM M.N. & LINDEN J.C._ Response surface optimization of *Lactobacillus plantarum* batch growth
in : Biotechnologie Letters, 1989, **11(11)**, 817-820.
- [22] SCHLEIFER K.H., KRAUS J., DVORAK C., KILPPER-BÄLZ R., COLLINS M.D. & FISCHER W .._ Transfer of *Streptococcus lactis* and related Streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov.
in : System . Appl. Microbiol , 1985, **6**, 183-195.

- COTTA (M.A.).** Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria . Appl. Environ. Microbiol. 1988, vol. 54, n° 3, p. 772-776.
- DUBOIS (M.), GILLES (K.A.), HAMILTON (J.K.), REBERS (P.A.), SMITH (F.).** _ Colorimetric method for determination of sugars and related substances . Anal. Chemistry, 1956, vol. 28, p. 350 - 356 .
- KETIKU (A.O.), OYENUGA (V.A.).** _ Preliminary report on the carbohydrate constituents of cassava root and yam tuber . Nigerian Journal of science, 1970, vol. 4, n° 1, p.25-30.
- KMET (V.), JAVORSKY (P.), NEMCOVA (R.), KOPECNY (J.), BODA (K.).** _ Occurrence of conjugative amylolytic activity in rumen lactobacilli . Zentralb Mikrobiol, 1989, vol.144, n°1, p.53-57.
- LINDGREN (S.), REFAI (O.).** _ Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage . Journal of Applied Bacteriology . 1984, vol. 57, p. 221-228.
- MILLER (G.L.).** _ Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars . Anal. Chemistry, 1959, vol. 31, p. 426 - 428.
- MUCHNICK (J.), VINCK (D.).** _ La transformation du manioc, technologies autochtones . 1984, Agence de Coopération Culturelle, Presses Universitaire de France
- OKAFOR (N.), IJIOMA (B.), OYOLU (C.).** _ Studies on the microbiology of cassava retting for foo-foo production. Journal of Applied Bacteriology, 1984, vol. 56, p. 1-13.
- REGEZ (P.F.), ZORZI (N.), NGOY (K.), BALIMANDAWA (M.).** _ Evaluation de l'importance de quelques souches de *Lactobacillus sp.* pour l'acidification de differents aliments à base de manioc . Lebensmittel- Technologie, 1988, vol. 21, p. 288-293 .
- SEALE (D.R.).** _ Bacterial inoculants as silage additives . J. Appl. Bact. Symp. Supp. 1986, vol. 61, n°15, 9S-26S
- SEN (S.), CHAKRABARTY (S.L.).** _ Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* D-39 isolated from vegetable wastes : characteristics of immobilized enzyme and whole cell. Enzymes Microb. Technol.1986, vol. 9 , p. 112-116.
- SCHEIRLINCK (T.), MAHILLON (J.), JOOS (H.), DHAESE (P.), MICHIELS (F.).** _ Integration and expression of alpha amylase and endoglucanase genes in *Lactobacillus plantarum* chromosome. Appl. Environ. Microbiol. 1989, vol.55, n°9, p. 2130-2137.
- SNEATH (P.H.A.).(éd.)** : Bergey's manual of systematic bacteriology, 1986, vol.2, Williams & Wilkins, Baltimore-London-los Angeles-Sydney .

VI - CONCLUSIONS GENERALES-

L'étude qui a été réalisée a permis de mieux préciser les limites d'utilisation de la souche de *Brevibacterium* comme inoculum lors de la fermentation de la pulpe de gari pour faciliter la dégradation des cyanures. Dans ce domaine les recherches se sont orientées vers le transfert des gènes de la nitrilase de *Brevibacterium* dans une bactérie lactique qui pourrait s'exprimer plus facilement dans ce type de fermentation.

Par ailleurs, un prototype de fermenteur permettant le contrôle du pH du jus de drainage et sa recirculation a été réalisé par le CEEMAT en vue de la mise au point d'un procédé permettant d'améliorer l'élimination des cyanures. Ce prototype pourrait être également utilisé pour réaliser des essais d'inoculation de souches lactiques.

Les études qui se sont déroulées au Congo ont permis de mieux connaître et de caractériser les différentes phases de la fermentation au cours du rouissage du manioc (immérgé ou à sec), en fonction de l'évolution de la composition des tubercules, l'élimination des cyanures, et l'apparition d'acides gras volatiles. Des bilans détaillés ont été établis et des études d'acceptabilité et de qualités organoleptiques des produits ont été réalisées. Le rouissage immérgé semble plus efficace, mais un rouissage contrôlé à sec peut également être envisagé quoi que moins rapide.

Des études microbiologiques d'écophysiologie de la microflore lors du rouissage du manioc a conduit à démontrer le caractère hétérolactique de la fermentation, alors qu'elle est essentiellement homolactique dans le cas de la fermentation de la pulpe de manioc lors de la fabrication du gari ou de l'amidon aigre. Des souches lactiques nouvelles ont pu être isolées à partir de racines en cours de rouissage dont un *Lactobacillus plantarum* (A6) fortement amylolytique, et un *Streptococcus pectinolyticus* très intéressantes, qui font l'objet d'études complémentaires.

On a pu également mettre en évidence la résistance des bactéries lactiques (particulièrement *Lactobacillus*) à des concentrations relativement élevées de cyanures, et démontrer que certaines souches lactiques sont capables de **dégrader la linamarine** et de la transformer en **acide lactique**. Des études complémentaires sont en cours pour savoir si ces bactéries peuvent être utilisées comme starters pour améliorer l'élimination des cyanures et la qualité des produits fermentés à base de manioc.

-RESUME SIGNALÉTIQUE-

Amélioration des mécanismes de détoxification du manioc lors des phases de fermentation.

Les études sur *Brevibacterium* ont porté essentiellement sur la recherche de vecteur de clonage pour le transfert des gènes de la nitrilase dans une bactérie lactique. Par ailleurs un prototype de fermenteur permettant le contrôle du pH du jus de drainage et sa recirculation a été réalisé en vue de la mise au point d'un procédé permettant d'améliorer l'élimination des cyanures.

Les études menées au Congo ont permis de mieux caractériser les différentes phases du rouissage du manioc (immergé ou à sec), de suivre l'évolution de la composition des tubercules, l'élimination des cyanures, et l'apparition d'acides gras volatiles. Des bilans détaillés ont été établis et des études d'acceptabilité et de qualités organoleptiques des produits ont été réalisées. Le rouissage immergé semble plus efficace, mais un rouissage contrôlé à sec peut également être envisagé.

Le suivi de la microflore lors du rouissage du manioc a conduit à démontrer le caractère hétérolactique de la fermentation, alors qu'elle est essentiellement homolactique dans le cas de la fermentation de la pulpe de manioc (gari, amidon aigre). Des souches lactiques nouvelles ont été isolées à partir de manioc roui, dont un *Lactobacillus plantarum* (A6) fortement amylolytique, et un *Streptococcus pectinolyticus*.

On a mis en évidence la résistance de bactéries lactiques à des concentrations élevées de cyanures, et démontré que certaines souches lactiques sont capables de dégrader la linamarine en acide lactique.