



MISE AU POINT D'UN FERMENT MIXTE DESTINE A LA BIOCONVERSION DES TUBERCULES DE MANIOC CYANOGENE

Roger Djoulde Darman

► To cite this version:

Roger Djoulde Darman. MISE AU POINT D'UN FERMENT MIXTE DESTINE A LA BIOCONVERSION DES TUBERCULES DE MANIOC CYANOGENE. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Ngaoundéré, 2004. Français. NNT: . tel-00007487v2

HAL Id: tel-00007487

<https://theses.hal.science/tel-00007487v2>

Submitted on 23 Jul 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix-Travail-Patrie
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
UNIVERSITE DE NGAOUNDERE

Ecole Nationale Supérieure des Sciences
Agro-industrielles



REPUBLIC OF CAMEROON
Peace-Work-Fatherland
MINISTRY OF HIGHER EDUCATION
THE UNIVERSITY OF NGAOUNDERE

National School of Agro-Industrial
Sciences

THESE

**MISE AU POINT D'UN FERMENT MIXTE DESTINE A
LA BIOCONVERSION DES TUBERCULES DE
MANIOC CYANOGENE**

***DEVELOPMENT OF A MIXT STARTER CULTURE FOR CASSAVA ROOTS
BIOCONVERSION***

**Thèse présentée à l'Ecole Nationale Supérieure Des Sciences Agro-
industrielles (ENSAI) de l'Université de Ngaoundéré**

En vue de l'obtention du

DOCTORAT/ Ph. D.

Par

DJOULDE DARMAN Roger

*Licence de biologie Appliquée, Maîtrise de Biologie Appliquée
Diplôme d'Etudes Approfondies en Sciences Alimentaires et Nutrition*

Matricule 98 D03 EN

RESUME

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est une plante, dont les tubercules servent de nourriture de base pour près de 800 millions de personnes sous les tropiques. Malgré son importance, ce tubercule présente deux inconvénients majeurs qui limitent leur utilisation en alimentation humaine : Une toxicité liée à la présence de composés cyanés, et une faible teneur en protéines. Dans l'optique de lever ces contraintes, plusieurs procédés de transformation ont été mis au point par l'expérience des populations et des améliorations ont été apportées par la recherche. La plupart de ces procédés incluent une étape critique de fermentation spontanée. Cette étape présente quelques problèmes dus à sa dépendance vis à vis des microorganismes épiphytes. Ces problèmes sont notamment la présence de quantités résiduelles de composés cyanés non négligeables (100 à 170ppm) un temps de ramollissement très long (4 à 5 jours) et des produits dérivés de qualités nutritionnelles et hygiéniques douteuses. Dans l'optique d'améliorer ces procédés traditionnels de rouissage du manioc cyanogène, une centaine de microorganismes ont été isolés des cossettes de manioc séché, sur la base de leurs potentialités à produire la β -glucosidase, l' α -amylase, la pectine hydrolase et la polygalacturonase. Ces enzymes sont les plus impliqués dans les phénomènes biochimiques et physico-chimiques ayant lieu au cours du rouissage du manioc. Ils sont responsables de la dégradation des composés cyanés et du ramollissement des tubercules par dégradation des pectines qui constituent le squelette du tubercule. 60% des microorganismes isolés et identifiés ont été productrices d' α -amylases, 46% de β -glucosidase, et 36% de pectinases. Les capacités des différentes souches sélectionnées à produire ces principaux enzymes, ont ensuite

été évaluées. Parmi ces microorganismes, deux se sont avérés particulièrement intéressantes : Une souche de bactérie lactique identifiée comme étant *Lactobacillus plantarum* avec une activité α -amylase de l'ordre de $17000 \pm 100 \text{ UE/ml}$, et une activité β -glucosidase de $2000 \pm 300 \mu\text{mol CN}^-/\text{mn}$; Une moisissure identifiée comme étant *Rhizopus oryzae* à activité α -amylase de $20000 \pm 500 \text{ UE/ml}$ et activité pectine hydrolase de $2,3 \pm 0,2 \mu\text{mol COO}^-/\text{mn/mg}$. Ces deux souches ont été sélectionnées et utilisées comme ferments en culture mixte avec une biomasse initiale de 10^6 ufc/g manioc frais de *Lactobacillus plantarum* et 10^3 spores/g manioc frais de *Rhizopus oryzae* pour la fermentation des tubercules de manioc. Les résultats obtenus ont indiqué une acidification rapide avec un pH avoisinant $3,5 \pm 1$ après 24 heures de rouissage, un ramollissement plus rapide ($12 \pm 3 \text{ mm/5s}$ après 48 heures de rouissage). Mais le rouissage naturel s'est avéré meilleur du point de vue dégradation des composés cyanés. En effet la très forte acidification obtenue avec le ferment dès la 24^{ème} heure, a provoqué un blocage du processus de dégradation des glucosides cyanogénétiques au niveau de la cyanohydrine, composé par ailleurs aussi toxique que l'acide cyanhydrique. Une étude de l'influence de quelques paramètres externes nous ont permis de noter que la température optimale de croissance de *Lactobacillus plantarum* était de $40 \pm 5^\circ\text{C}$ pour un pH optimal de 6 alors que *Rhizopus oryzae* avait une température optimale de croissance à $30 \pm 7^\circ\text{C}$ et un pH optimal de 5. Les essais de production de biomasses, indiquent que le meilleur milieu de multiplication des germes s'est avéré être le milieu CTM de Law *et al.*, avec pour substrat de la farine de son de manioc mélangée au milieu nutritif de Meyer.

Dans l'optique de mettre à la disposition des populations ce ferment, des essais de conservation des souches par séchage ont indiqué que le fluide de protection indiqué pour avoir des taux de survies acceptables au terme du séchage était le glycérol, alors que le support le plus adapté a été l'amidon de manioc. On a ainsi obtenu plus de $75\pm 5\%$ de survivants après séchage sur lit convectif à une température de 35°C sous un débit d'air de $10\text{ m}^3/\text{h}$ pour tous les deux germes. Ce ferment composé de *Lactobacillus plantarum* (10^6ufc/g) et *Rhizopus oryzae* (10^3spores/g), sur support amidon a induit contrairement aux microorganismes frais, une diminution effective du taux de glucosides totaux résiduels (5% en fin de rouissage) diminution corollaire à l'ajout du NaOH réalisé après la 24^{ème} heure, afin de contourner l'effet néfaste du pH acide sur la dégradation de la cyanohydrine.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots serve as food for more than 800 million people in the tropics. Despite this useful application, two drawbacks limit the utilisation of these roots as human food: These are its low protein content and potential cyanide toxicity. Traditional processing methods used by people in the rural areas to reduce these bottlenecks, always include a typical step of fermentation which occurs spontaneously. This natural fermentation is plagued with many problems related to its dependence on the chance of inoculation from the environment. These problems include high levels of residual cyanide (100 to 170ppm), long softening time (4 to 5 days), non-reproducible quality and unhygienic products. To solve these problems, about one hundred microorganisms were isolated from dried fermented cassava tubers, on the basis of their ability to produce β -glucosidase, α -amylase, pectin hydrolase and polygalacturonase. These enzymes are involved in biochemical and physicochemical phenomena, which occur in cassava natural fermentation and are responsible for the degradation of cyanide compounds and tuber softening by degrading pectin, which constitutes the major part of cassava cell wall. Among these isolates 60% were identified as α -amylase producers, 46% as β -glucosidase producers, and 36% pectinase producers.

The ability of these selected microorganisms to produce enzymes was screened. Among the isolates, two microorganisms were found to be particularly interesting: lactic acid bacteria identified as *Lactobacillus plantarum*, showing α -amylase activity of $17000 \pm 100 \text{ UE/ml}$, and β -glucosidase activity of $2000 \pm 300 \mu\text{mol CN}^-/\text{mn}$; a mould

identified as *Rhizopus oryzae* with an α -amylase activity of $20000 \pm 500 \text{ UE/ml}$ and pectinhydrolase activity of $2,3 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{mol COO}^-/\text{mn/mg}$. These strains were selected and used as starter culture for cassava fermentation. The use of these strains as a mix starter culture (10^6 fuc/g fresh cassava tubers of *Lactobacillus plantarum* and 10^3 spores/g fresh cassava tubers of *Rhizopus oryzae*) for cassava retting rapidly softened the roots ($12 \pm 3 \text{ mm/5s}$ after 48 hours of retting), and induced a rapid decrease in pH (3,5 after 24 hours of fermentation). However, natural fermentation was found to reduce more cyanide than starter fermentation. The rapid acidification observed with starter fermentation was found to be responsible of this low cyanide degrading activity by starter strains as low pH stops the reaction at the cyanohydrins step.

Studies on the effect of environment on starter strains show that *Lactobacillus plantarum*'s optimal growth temperature was $40 \pm 5^\circ\text{C}$ for an optimal pH of 6, while *Rhizopus oryzae* show an optimal growth temperature of $30 \pm 7^\circ\text{C}$ for an optimal pH of 5. These strains also showed a good growth rate on Law *et al.*, cassava medium (CTM).

With the aim of large-scale utilization of this starter culture, the microorganisms were tested for their ability to withstand drying conditions. Survival of *Lactobacillus plantarum* and *Rhizopus oryzae* after drying was determined under various support conditions. The support constituting starch and glycerol as protectants was found to be the best with more than $75 \pm 5\%$ survivors after drying at 35°C under a hot air flow of $10 \text{ m}^3/\text{h}$. The use of the dried mix starter for cassava retting permit the reduction of the total cyanide content by about $95 \pm 4\%$, as NaOH were added after 24 hours of fermentation to enable a drop in the pH level to 5. This enabled us to solve the bad

effect of low pH on cyanide reduction observed by the fermentation of tubers using mixed starter cultures.

DEDICACES

A mon feu Grand père le Rev. DARMAN Paul

A mes parents DARMAN Jean Marc (*BABA*) et DONYANGA Priscilla Hélène (*NEE*), et mon épouse TENE Denise (*TANTINE*)

Vos efforts pour me soutenir n'ont pas été vains !!!

A mes enfants, mes frères et sœurs :

TASSONA B.D, FORO Y.Z.D, DOFIO K.D, ADAMA D.T, ABDOULAYE J.R,
HAMADOU D.M, NDAKO A.J, DOUKOU D.E, Dr. DARMAN J. J ET DUI L.M-J.

èn dé gan èè!! èn ne si ti !!

REMERCIEMENTS

Je ne saurais commencer la rédaction de ce mémoire sans exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ces travaux ; je pense particulièrement :

Au Pr. François-Xavier ETOA, au Dr Jean-Justin ESSIA NGANG et au Pr. Carl M.F. MBOFUNG dont les charges administratives et académiques n'ont empêché ni amoindries l'implication aussi bien dans la conception, le suivi et la correction de ce travail.

Au Pr. NJINE Thomas de l'Université de Yaoundé I, au Dr. TCHANGO TCHANGO Jean de l'Institut de Recherche Agricoles pour le Développement, au Pr. NJOUENKEU Robert et au Pr. TENIN D. qui ont acceptés d'évaluer et de présider le jury de soutenance de cette thèse.

A tous les enseignants du Département des Sciences Alimentaires et Nutrition de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro-industrielles qui n'ont ménagé aucun effort en participant aux différents séminaires de suivi du déroulement des travaux de cette thèse. Leurs remarques, et leurs conseils ont été déterminants aussi bien pour l'orientation que pour la finalisation de ce travail.

A mes camarades de Ph.D, et mes collègues Chercheurs du Centre Régional IRAD de Maroua, dont l'aide a été précieuse aussi bien pour leurs critiques constructives que par les encouragements et les corrections apportées à la finalisation de cette thèse.

CERTIFICATION

This is to certified that this work was carried out by Mr **DJOULDE DARMAN Roger**, under our supervision

Directeur

François-Xavier ETOA

Professeur

Département de Biochimie Université de Yaoundé I

Co-Directeur

Jean-Justin ESSIA NGANG

Chargé de cours

Département de Biochimie Université de Yaoundé I

Co-Directeur

Carl M.F. MBOFUNG

Professeur

Département des Sciences Alimentaires et Nutrition Université de Ngaoundéré

TABLE DE MATIERES

	Page
TITRE.....	I
RESUME.....	ii
ABSTRACT.....	v
DEDICACES.....	viii
REMERCIEMENTS.....	ix
CERTIFICATION.....	x
TABLE DE MATIERES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xvi
LISTE DES FIGURES.....	xviii
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	xx
INTRODUCTION	1
Chapitre 1 REVUE DE LA LITTERATURE.....	9
I- GENERALITES SUR LE MANIOC.....	9
I-1- Historique et description de la plante.....	9
I-2 Production et utilisations des tubercules de manioc.....	11
I-3 Composition du tubercule de manioc.....	16
I-4 Apports nutritifs du tubercule de manioc.....	17
I-5 Toxicité du manioc.....	18
II BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE DU ROUISSAGE DU MANIOC.....	21
II-1- Aspect Biochimique du rouissage du manioc.....	21
II-1-1 Dégradation chimique des composés cyanés au cours de la transformation du manioc.....	21
II-1-2 Ramollissement des tubercules au cours du rouissage.....	23
II-2 Rôle des micro-organismes dans le rouissage du manioc.....	24
II-2-1 Les bactéries lactiques.....	24
II-2-2- Les champignons (levures et moisissures).....	28
II-3 Etude biochimique du rouissage traditionnel des racines de manioc.....	31
III PRODUCTION ET CONSERVATION DES MICRORGANISMES.....	33
III-1- Production de la biomasse.....	33
III-1-1 Production des bactéries.....	33
III – I -2 Production des levures.....	34

III-I-3 Production des moisissures.....	36
III-2 Généralités sur la conservation des micro-organismes.....	36
III-2-1- La conservation à l'huile de paraffine.....	37
III-2-2- La lyophilisation.....	38
III-2-3- La stabilisation sur terre (stock soil culture).....	39
III-2-4- Maintenance de viabilité.....	40
III-2-5- Changement de population par sélection	40
IV- MISE AU POINT DE STARTERS DE FERMENTATION DU MANIOC.....	41
Chapitre 2 SCREENING DES MICROORGANISMES A POTENTIALITÉS FERMENTAIRES POUR LE MANIOC.....	42
I- Introduction.....	42
II- Matériel et méthodes.....	44
1- Echantillonnage	44
2- Isolement des micro-organismes.....	45
2-1 Milieu d'isolement.....	45
2-2 Isolement.....	45
3- Sélection des micro-organismes : Production qualitative des enzymes.....	46
3-1 Sélection des micro-organismes a activité amylolytique.....	46
3-2 Sélection des micro-organismes à activité β -glucosidase.....	47
3-3 Sélection des micro-organismes à activité pectinolytique	48
4 Identification.....	48
5- Evaluation de l'activité enzymatique.....	49
5- 1 Préparation du matériel végétal.....	49
5- 2 Préparation des inoculums.....	49
5- 3 Ensemencement et conduite de la fermentation.....	50
6- Extraction et dosage des enzymes.....	51
6- 1 Préparation du matériel d'analyse et extraction partielle des enzymes.....	51
6 -2- La linamarase (EC : 3.2.1.21).....	52
6 -3- Les pectinases.....	53
6 -4- l' α -amylase (EC 3.2.1.1).....	54
7 - Dosage des sucres résiduels.....	55
7 -1- La linamarine.....	55

7 -2- L'amidon.....	55
8- Suivi de la croissance microbienne.....	56
8 -1 Dénombrement direct sur cellules.....	56
8 -2 Dénombrement sur milieu sélectif solide.....	56
III- Résultats	58
1- Les bactéries lactiques des cossettes de manioc.....	58
2- Les levures et moisissures des cossettes de manioc	64
3-Activité enzymatique des souches sélectionnées.....	66
VI – Discussion.....	76
VII- Conclusion partielle.....	81
Chapitre 3 EVALUATION DE LA BIOCONVERSION DES TUBERCULES DE MANIOC PAR LES SOUCHES DE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ET <i>RHIZOPUS ORYZAE</i>	84
I- Introduction.....	84
II- Matériels et méthodes.....	86
II-1 Expérimentations.....	86
II-2 Préparation des inoculums.....	87
II-2-1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	87
II-2-2 <i>Rhizopus oryzae</i>	87
II - 3- Protocole de rouissage.....	88
II-4- Analyses physico-chimiques.....	89
II-4-1) Indice de pénétrométrie.....	89
II-4-2) pH des racines en fermentation.....	90
II-4-3) Dosage des cyanures totaux.....	90
II-4-4) Dosage des protéines totales.....	91
III- Résultats	93
III-1.- Evolution du potentiel d'hydrogène au cours du rouissage naturel et du rouissage avec les différentes formulations du ferment.....	93
III 2- Ramollissement au cours du rouissage.....	97
III 3- Evolution des Cyanures totaux au cours du Rouissage.....	103
III 4 Evolution des Protéines totales au cours du Rouissage.....	107
IV- Discussion.....	111
V- Conclusion.....	115

Chapitre 4 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE, ET DU PH SUR L'ACTIVITE DE SOUCHES DE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ET <i>RHIZOPUS ORYZAE</i>	117
I- Introduction.....	117
II- Matériel et Méthodes.....	118
1. Expérimentations.....	118
2. Préparation des inocula.....	118
3. Influence de la température.....	119
4. Influence du pH des milieux de culture des souches.....	119
5. Analyses biochimique et microbiologique.....	120
5- 1- Extraction et dosage des enzymes	120
5- 2 Dosage des sucres et composés cyanés résiduels.....	120
5- 3- Suivi de la croissance microbienne.....	121
6-Analyses statistiques.....	121
III- Résultats	122
III- 1- Influence de la température sur la croissance des microorganismes sélectionnés.....	122
III- 2- Influence du pH du milieu de culture sur la croissance et la dégradation de l'amidon.....	131
III- 3- Influence du pH sur la dégradation des composés cyanés par les microorganismes sélectionnés.....	136
III- 4- Influence de la température sur la production des enzymes par les microorganismes sélectionnés.....	137
VI- Discussion.....	141
VII- Conclusion.....	142
Chapitre 5 PRODUCTION ET SECHAGE DE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ET <i>RHIZOPUS ORYZAE</i> SUR QUELQUES SUPPORTS LOCAUX.....	144
I- Introduction.....	144
II- Matériel et méthodes.....	146
1. Préparation des inoculums.....	146
2. Préparation des substrats.....	146
2-1 La source de carbone.....	146

2-2- Pré-traitement des substrats.....	147
2-3- Nutriments.....	147
3. Conduite de la fermentation.....	148
4. Préparation des concentrées.....	149
5- Préparation du support.....	149
6- Ajout de l'agent de protection et du support.....	150
7- Ajustement de l'activité de l'eau (a_w) par équilibrage par des solutions saturées.....	150
8- Séchage.....	151
9- Dispositif expérimental.....	151
10- Méthodes analytiques.....	151
III -Résultats et discussions.....	154
1- Influence du milieu de culture sur la croissance des microorganismes.....	154
2- Effet de l'agent protecteur et du support sur la survie des microorganismes du Ferment au cours du séchage.....	157
3- Effet de la température de séchage et du débit d'air sur la survie des souches du ferment.....	162
Conclusion partielle.....	166
Chapitre 6 BIOCONVERSION DU MANIOC CYANOGENE PAR <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ET <i>RHIZOPUS ORYZAE</i> SECHES SUR SUPPORT AMIDON.....	167
I- Introduction.....	167
II- Matériel et méthodes.....	168
1. Préparation et utilisation du ferment.....	168
2. Méthodologie.....	169
4. Méthodes analytiques.....	170
III- Résultats et discussions.....	170
Conclusion partielle.....	180
CONCLUSION GENERALE.....	181
BIBLIOGRAPHIE.....	185
ANNEXES.....	201
PUBLICATIONS SEMINAIRES ET COLLOQUES.....	203

LISTE DES TABLEAUX

	N° Page
Tableau 1: Caractéristiques de quelques Streptobacteriums isolés des cossettes de manioc.....	60
Tableau 2: Caractéristiques de quelques-uns des thermobacteriums isolés des cossettes de manioc.....	60
Tableau 3: Caractéristiques de quelques-uns des betabacteriums isolées des cossettes de manioc.....	61
Tableau 5 : Production qualitative des enzymes par les lactobacilles isolés....	63
Tableau 6 : Production qualitative des enzymes par les levures et moisissures isolées	65
Tableau 7 : Equations de Cinétiques de disparition des substrats (Amidon et linamarine) selon les microorganismes.....	69
Tableau 8 : Corrélations entre l'activité des enzymes et les substrats dégradés	69
Tableau 9 : Analyse des variances du pH des différentes formulations du starter au cours du temps	95
Tableau 10 : Classement des réponses pH en fonction des inoculums.....	95
Tableau11 : Analyse des variances du ramollissement obtenu par différentes formulations du starter.....	100
Tableau 12 : Comparaison des moyennes de ramollissement en fonction des inoculums.....	102
Tableau 13 : Analyse des variances de la dégradation des glucosides obtenus par différentes formulations du starter.	107
Tableau 14 : Comparaison des moyennes de glucosides totaux résiduelles en fonction des inoculums.....	107
Tableau 15 : Analyse des variances de l'augmentation des protéines obtenues par différentes formulations du starter.....	110
Tableau 16 : Comparaison des moyennes de glucosides totaux résiduelles en fonction des inoculums.....	110
Tableau 17 : Multiple range test à 95% LSD, permettant de voir les écarts de réponses entre les différentes températures pour la souche de <i>Lactobacillus plantarum</i>	129

Tableau 18 : Multiple range test à 95% LSD, permettant de voir les écarts de réponses entre les différentes températures pour la souche de <i>Rhizopus oryzae</i>	130
Tableau 19 : Analyse de régression multiple pour l'effet du pH sur la biotransformation de l'amidon du manioc par <i>Lactobacillus plantarum</i>	133
Tableau 20 : Analyse de régression multiple pour l'effet du pH sur la biotransformation de l'amidon du manioc par <i>Rhizopus oryzae</i>	134
Tableau 21 : Analyse de variances relatives aux biomasses obtenus sur divers milieux.....	156
Tableau 22 : Influence du débit d'air sur la survie des microorganismes du ferment au cours du séchage sur lit fluidisé.....	166

LISTE DES FIGURES

	Page
Fig.1: Schéma du procédé d'évaluation de la production des enzymes.....	57
Fig. 2 : Activité amylolytique (A et B) et dégradation de l'amidon de manioc (C et D) au cours du temps par les souches sélectionnées.....	70
Fig. 3 : Production de linamarase et dégradation de la linamarine purifiée par les souches sélectionnées au cours du temps.....	73
Fig. 4 : Production de la pectine hydrolase et de la polygalacturonase par les souches sélectionnées au cours du temps.....	75
Fig. 5 : méthodologie d'évaluation de l'activité des souches isolées	92
Fig. 6: Evolution du pH au cours du temps en fonction des inoculums.....	95
Fig. 7 : Ramollissement du manioc au cours des essais avec différentes formulations du ferment.....	99
Fig. 8 : Evolution des cyanures totaux au cours des divers essais.....	105
Fig. 9 : Evolution des protéines totales au cours des essais de rouissage naturel, stérile et avec les trois compositions de notre ferment.....	108
Fig. 10 : Evolution de la biomasse de <i>Lactobacillus plantarum</i> au cours du temps en fonction des températures.....	124
Fig. 11 : Evolution de la biomasse de <i>Rhizopus oryzae</i> au cours du temps en fonction des températures	124
Fig. 12: « Box and Whisker » plot montrant l'influence de la température sur la biomasse, de <i>Lactobacillus plantarum</i>	128
Fig 13: « Box and Whisker » plot montrant l'influence de la température sur la biomasse, de <i>Rhizopus oryzae</i>	128
Fig. 14 : Influence du pH sur la croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> , et la dégradation de l'amidon en sucres fermentescibles.....	132
Fig. 15 : Influence du pH sur la croissance de <i>Rhizopus oryzae</i> , et la dégradation de l'amidon en sucres fermentescibles.....	132
Fig. 16 : Effet du pH sur la dégradation des composés cyanés.....	136
Fig. 17 : Influence de la température sur la production des enzymes.....	139
Fig. 18 : Préparation du Ferment.....	153
Fig. 19 : Evolution de la biomasse de <i>Lactobacillus plantarum</i> et <i>Rhizopus</i>	

<i>oryzae</i> sur quelques substrats en bioréacteur.....	155
Fig. 20 : Effet des agents de protection sur la survie des souches de <i>Lactobacillus plantarum</i> et de <i>Rhizopus oryzae</i> lors du séchage.....	158
Fig. 21 : Taux de survie des microorganismes du ferment sur différents supports à température ambiante.....	161
Fig. 22 : Effet de la température de séchage sur la survie de <i>Lactobacillus plantarum</i> et <i>Rhizopus oryzae</i> sur différents supports.....	163
Fig. 23 : Evolution du pH au cours des différents essais de Rouissage.....	172
Fig. 24 Evolution du ramollissement au cours des essais de rouissage.....	173
Fig. 25: Distribution des glucosides résiduels totaux après rouissage des tubercules de manioc par nos différentes Starter.....	176
Fig. 26: Distribution des protéines totales après rouissage.....	177
Fig. 27 : Evolution des entérobactéries totales au cours du rouissage naturel au labo du rouissage naturel d'une ménagère et du rouissage avec le ferment	179
Fig. 28 : Evolution des sulfito-réducteurs totaux au cours du Rouissage naturel au labo, du rouissage naturel d'une ménagère, et du rouissage avec le ferment.....	179

LISTE DES ILLUSTRATIONS

	Page
Photo 1 : Jeune plant de manioc	10
Photo 2 : Racines de manioc	10
Schéma 1 : Utilisations du manioc selon Laure (1981).....	14
Schéma 2 : Structure chimique de la linamarine.....	19
Schéma 3 : Décomposition chimique de la linamarine	21
Dessin <i>Rhizopus oryzae</i> (X100) et photographie au microscope électronique à balayage de <i>Lactobacillus plantarum</i> (X10000).....	59
Photo 3 : Test qualitatif d'activité β -glucosidase.....	62
Photo 4 : Test qualitatif d'activité α -amylase.....	62
Photo 5 : Dégradation d'une granule d'amidon par la souche de <i>Lactobacillus plantarum</i>	68
Photo 6 : Observations microscopiques (X1000) de coupes de tranches de manioc au cours du rouissage stérile et du rouissage avec le starter	101

INTRODUCTION

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est l'un des plus importants tubercules des pays tropicaux. Il constitue la nourriture de base de 800 millions de personnes dans le tiers monde (De Bruijn et Fresco, 1989)

L'intérêt de ce tubercule réside dans le fait :

- qu'il s'accommode aux conditions climatiques difficiles et aux sols médiocres, offrant ainsi une large tolérance dans le choix de la période de récolte et permettant de rendre les racines disponibles au moment des besoins (Trèche, 1995);
- que les technologies de transformation du manioc sont faciles, et maîtrisées par la plupart des populations, ce qui a comme corollaire le développement de plusieurs types de produits traditionnels (Cossettes, Chikwangué, Fufu, Gari, Tapioca...etc) (Bokanga, 2001).

Malgré ces atouts, ce tubercule présente quelques problèmes dont une faible teneur en protéines, une détérioration post récolte rapide (Richard, 1985) et une toxicité liée à la présence des glucosides cyanogénétiques que sont la linamarine et à une moindre mesure, la lautostraline (Nartey, 1978)

Ces glucosides cyanogénétiques du manioc sont responsables des manifestations visibles tels que le goitre, le crétinisme, la neuropathie ataxique, la xérophtalmie...(Bourdoux *et al.*, 1982)

Des procédés traditionnels de transformation ont été mis au point aussi bien par l'ingéniosité des paysans que par la recherche et le développement dans l'espoir de les améliorer et surtout réduire la toxicité cyanogénétique. Ces procédés traditionnels qui incluent le rouissage, le séchage du manioc, mis au point par l'expérience des paysans (Bokanga, 2001) et la mise au point des starters par la recherche développement (Ejiorfor, 1982, Giraud *et al.*, 1995, Olukoya, 1995, Djoulde *et al.*, 2000) ont apporté une nette amélioration à la qualité toxicologique et nutritionnelle des produits dérivés du manioc.

Mais les technologies acquises par l'expérience des paysans, requièrent un travail long et pénible (Bokanga 2001). Par ailleurs les starters mis au point par la recherche développement présentent encore quelques problèmes.

En effet, le starter mis au point par Giraud *et al.* (1995) constitué d'une seule souche de *Lactobacillus sp.* Lacto Labo, avait pour objectif d'acidifier rapidement le milieu afin d'inhiber les autres germes et aussi obtenir une seule phase homofermentaire très recherchée lors de la fabrication des farines infantiles. Or cette acidification rapide avait pour effet de bloquer les processus de dégradation de la linamarine (composé toxique des tubercules) au stade de la cyanohydrine, car aux pH inférieures à 5.5 la deuxième phase de dégradation de la cyanohydrine en acide cyanhydrique est équilibrée (Cooke, Blake et Battershill

1978). Par ailleurs différents types de microorganismes (*Baccillus subtilis*, *Klebsiella spp.*, *Candida krusei*) ont été utilisés comme starter pour la fermentation du manioc cyanogène (Oyewole, 1990, Ofuya et Najiorfor, 1989). Les résultats obtenus ont indiqué comme précédemment une forte acidification du milieu. En plus de cette phase d'acidification, on a noté une augmentation des protéines totales par utilisation de la souche de *Candida krusei*, mais cette dernière n'étant pas amylolytique il fallait au préalable digérer l'amidon de manioc avant utilisation de ce ferment. Cette étape de digestion de l'amidon nécessite l'utilisation d'exo enzymes qui ne sont pas à portée du paysan en zone rurale. Enfin, les travaux de Djoulde *et al.*, (2000) ont conduit à la mise au point d'un starter composé de trois souches dont *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, et *Rhizopus sp.* En effet la souche de *Lactobacillus plantarum*, amylolytique, et productrice de linamarase, était combinée à une souche de *Saccharomyces cerevisiae* qui utilisait l'azote libéré par le lactobacille pour produire de du NH_3 . Le NH_3 ainsi produit avait pour effet d'induire un effet tampon du milieu favorisant ainsi la dégradation de la cyanohydrine. Une troisième souche *Rhizopus sp.* a été ajouté afin d'augmenter les protéines totales des dérivés du manioc par les protéines d'organismes. Malheureusement ce starter présentait encore quelques inconvénients. Le starter constitué de trois microorganismes était en effet très complexe et la manipulation nécessitait beaucoup d'expérience que l'on ne pouvait pas espérer avoir en milieu paysan, de plus les farines produites étaient de couleurs jaunâtres, dû probablement à la

souche de *Saccharomyces cerevisiae*. Enfin les processus de ramollissements étaient assez limités et la durée du rouissage n'était pas différente de celle d'une fermentation naturelle.

En effet si le facteur de détoxification constitue une limite à l'utilisation des starters, le facteur ramollissement n'est généralement pas pris en compte au cours de la mise au point des starters. Or le développement de l'urbanisation en Afrique dû à une démographie galopante et surtout le coût de plus en plus élevé des produits importés (pour nos populations dont le niveau de vie a considérablement baissé) ont entraîné une demande de plus en plus importante d'aliments à base de manioc (Bokanga, 2001). Ceci entraîne un écourtage (short-cuts) de l'étape de fermentation par les producteurs ce qui aboutit à des dérivés contenant encore des quantités résiduelles assez importantes de glucosides cyanogénétiques. Par ailleurs Ampe *et al.*, (1995) indique que le ramollissement grâce à la destruction des structures cellulaires, entraînerait un lessivage du contenu et permet ainsi de mettre en contact la linamarine et la linamarase endogène. Ceci abouti à une dégradation non négligeable d'une bonne partie de glucosides cyanogénétiques.

Toutes ces limites liées aussi bien aux processus naturels de rouissage du manioc et aux procédés mis au point jusqu'ici pour les améliorer, ne garantissent pas souvent la qualité nutritionnelle, hygiénique et la stabilité des produits finis dérivés du manioc (Bokanga 2001).

Afin de couvrir la demande tout en garantissant la santé des consommateurs, et faire face à la concurrence des produits amylacés importés,

l'amélioration et l'optimisation des procédés traditionnels mis au point par l'expérience des paysans et la recherche deviennent une nécessité.

Objectif général : L'objectif de ce travail est d'une part de trouver une ou plusieurs souches se caractérisant par des propriétés physiologiques et métaboliques particulières dont la production de β -glucosidase (qui interviendra dans la décomposition des glucosides cyanogénétiques du manioc), d' α -amylases (le tubercule de manioc étant composé à près de 90% d'amidon), et de pectinases (qui interviendraient dans la dégradation des pectines des parois cellulaires et par conséquent induiraient le ramollissement des tubercules) dont l'inoculation permettrait d'assurer la maîtrise de l'étape de fermentation lors de la production des principaux dérivés du manioc. D'autre part, étudier l'effet d'un tel inoculum sur la fermentation naturelle du manioc

Hypothèse générale de travail : L'inoculation du manioc avec un ferment de micro-organismes qui répondraient le mieux aussi bien individuellement ou en culture mixte, aux critères sus énumérés dans l'objectif général de travail, permettrait la maîtrise de l'étape de fermentation. Cette maîtrise de l'étape de fermentation pourra avoir comme corollaire, une amélioration des procédés de transformation (ramollissement plus rapide) et l'obtention des dérivés de meilleure qualité nutritive, toxicologique, et hygiénique.

Objectifs spécifiques :

Objectif spécifique 1 : Sélectionner une ou plusieurs souches qui produiraient la β -glucosidase, l' α -amylase et des pectinases, en vue de les utiliser comme ferment du manioc;

Objectif spécifique 2 : Evaluer l'importance des enzymes produites par les souches sélectionnées ;

Objectif spécifique 3 : Réaliser une étude physiologique et biochimique des microorganismes sélectionnés, sur les différents milieux à base d'amidon de manioc et sur milieux conventionnels (MRS, Sabouraud et PDA) afin de dégager quelques conditions optimales de leur production et étudier l'influence de quelques facteurs externes tels la température et le pH sur la croissance et la production des métabolites par ces germes ;

Objectif spécifique 4 : Evaluer directement l'aptitude des microorganismes sélectionnés, à améliorer la fermentation du manioc en les inoculant en souche pure ou en culture mixte dans du manioc cyanogène ;

Objectif spécifique 5 : Dégager les conditions optimales de conservation des micro-organismes isolées;

Objectif spécifique 6 : Evaluer les performances du ferment séché, en milieu réel ;

Hypothèses

Hypothèse 1 : Parmi les microorganismes épiphytes responsables de la fermentation naturelle du manioc, il est possible que certains puissent produire des enzymes responsables de phénomènes physico-chimiques et biochimiques

bénéfiques (détoxification, ramollissement) ayant cours lors de la fermentation naturelle du manioc.

Hypothèse 2 : L'intervention des microorganismes au cours de la fermentation induit un grand nombre de phénomènes aussi bien physiques, chimiques que biochimiques. La qualité nutritionnelle et hygiénique des produits dérivés pourrait dépendre, de tous ces aspects.

Hypothèse 3 : Le choix des germes à utiliser comme starter, devrait à tous points de vue être représentatifs, sinon rassembler les caractéristiques des germes présents au cours d'une fermentation naturelle afin de favoriser d'éventuels effets synergiques, l'amélioration d'une fermentation de type artisanale pourrait nécessiter le respect de la balance des différentes espèces microbiennes présentes au cours d'une fermentation naturelle.

Hypothèse 4 : L'amélioration d'une fermentation de type artisanale pourrait nécessiter l'utilisation d'une biomasse initiale pure et en quantité. Il est impératif de penser à déterminer les conditions optimales de multiplication de ces germes.

Hypothèse 5 : Les micro-organismes à utiliser comme ferment pourraient nécessiter d'être conditionnés, stockés et conservés, la possibilité de stocker la biomasse devra par conséquent être envisagée.

Chapitre 1

REVUE DE LA LITTERATURE

I- GENERALITES SUR LE MANIOC

Le manioc est cultivé essentiellement pour ses racines (tubercules), qui entre dans l'alimentation quotidienne de nombreuses populations, surtout africaines. On utilise aussi ses feuilles et accessoirement ses tiges qui servent parfois à préparer un sel alimentaire (Laure, 1981).

I-1- Historique et description de la plante

Originaire des Antilles et du Brésil, le manioc fut introduit en Afrique par des marchands portugais (Bombily, 1995). C'est une plante ligneuse des tropiques d'une hauteur de un à trois mètres, à feuilles digitilobées alternes et à latex blanc, appartenant à la famille des Euphorbiacées (Photo 1). Il existe plusieurs espèces de manioc dont les plus répandues sont : *Manihot esculenta* Crantz (Synonyme de *Manihot utilisima* Pohl) et *Manihot glaziovii*. Mais c'est *Manihot esculenta* Crantz généralement appelé manioc comestible, qui est le plus apprécié. Sa racine, au cours de son développement dans le sol, se gorge de principe actif et devient charnu (Photo 2). Cette partie de la plante appelée indifféremment tubercule dans certaines régions, est la partie la plus utilisée. Le rendement optimal du manioc est obtenu sous 1200 à 1500 mm de pluie, à la température moyenne de 23°C à 24°C avec deux à trois mois de saison sèche. Le sol idéal est sablo-argileux, bien drainé avec un pH voisin de 6 (Nartey 1978).



Photo 1 : Jeune plant de Manioc (*photo Djoulde2002*)



Photo 2 : Racines de manioc (*photo Djoulde 2004*)

I-2 Production et utilisations des tubercules de manioc

Production

Le manioc est produit dans les pays tropicaux et subtropicaux d'Amérique, d'Afrique et d'Asie. Selon les pays, il prend différents noms: *cassava* dans les pays anglophones d'Afrique, tapioca (Malaisie, Indonésie, Inde, Pacifique), *manihot*, *mandioca* et *uca* en Amérique latine, *bafilinapaka* (République malgache), *Bankye* (Ghana), Agbeli (Togo) et *mandioka* (Gambie) (Laure, 1981).

Le manioc peut être considéré comme la quatrième production végétale pour sa contribution (92 842 000 tonnes en 1992) à l'alimentation de la population mondiale après le riz (365 961 000 t), le blé (338 361 000 t) et le maïs (112 953 000 t) (Bokanga, 2001). C'est la septième culture mondiale en surface cultivée (Laure, 1981). Il est produit et utilisé en alimentation humaine sur les cinq continents, à l'exception de l'Europe, mais son importance tant économique qu'alimentaire est très variable d'une région à l'autre. Le Brésil est le plus gros producteur (25,5 % de la production mondiale). Viennent ensuite l'Indonésie (12 %), le Nigeria (10,3 %), le Zaïre (9,4 %), la Thaïlande (7,5 %). L'Amérique du Sud et l'Asie exportent la majeure partie de leur production, tandis qu'en Afrique, celle-ci est consommée localement. Il existe de plus en plus de recherche sur le manioc du fait de l'intérêt croissant qui lui est porté comme culture d'exportation.

La culture - la plante

La culture se fait surtout en zone forestière en Afrique, mais les méthodes de culture autochtones en savane ou en forêt sont à peu près les mêmes. Le sol reçoit peu de préparation, parfois il est simplement défriché par brûlis. La multiplication se fait par bouturage. L'entretien est simple et ne demande que deux à trois sarclages. Le manioc demande peu d'engrais. Il peut être associé à d'autres cultures (maïs, arachide, sésame). Il se cultive pendant la saison des pluies (Laure, 1981).

Le manioc s'accommode de terres médiocres, procure toujours un rendement, s'adapte aux conditions climatiques sévères (il ne craint pas les fortes pluies, est très résistant à la sécheresse), est peu sensible aux maladies et aux attaques des prédateurs. La récolte annuelle n'est pas obligatoire: les tubercules peuvent être conservés dans le sol plusieurs mois (intérêt pendant la période de soudure) (Trèche, 1995).

Tous ces avantages expliquent son expansion, aux dépens des cultures de maïs et d'igname plus exigeants en travail. Cependant, cette expansion n'est pas sans danger: le manioc a un impact négatif sur la fertilité des sols déjà pauvres, et surtout, utilisé comme aliment principal, il constitue une menace de malnutrition (Laure, 1981).

Les racines ou tubercules sont en nombre variable, en direction oblique dans le sol et mesurent de quarante centimètres à deux mètres de long (photo 2).

Selon la teneur en acide cyanhydrique de ces tubercules, on peut grouper les nombreuses variétés de manioc en deux catégories principales:

- le manioc doux: cultivé pour la consommation locale de ses tubercules;
- le manioc amer: surtout utilisé pour la préparation de fécule et d'autres dérivés (Nartey, 1978).

Utilisation en alimentation humaine

Les différentes formes de consommation du manioc rencontrées au monde comprennent des produits bruts ou semi-bruts :

- les produits bruts ou semi-bruts (dont les racines crues et les produits frais) ;
- des produits élaborés nécessitant une longue période de fabrication dont les racines cuites à l'eau ou à la braise et les racines rouies (Massamba et Trèche, 1993; Trèche et Massamba, 1995).

Ces derniers produits constituent une forme de consommation importante des racines de manioc en Afrique.

Parmi les produits élaborés, on peut citer: la bouillie, la farine ou fufou, la chikwangué (Massamba et Trèche;1994; Trèche, 1995) ;

le *Too*, préparé à partir de la farine de manioc provenant de tranches de racines séchées, pilées au mortier puis tamisées ;

le *gelen* préparé par cuisson dans de l'eau, des racines de manioc, qui sont ensuite pillés dans un mortier en bois jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène consommée avec une sauce très gluante,

le Gari, le tapioca et le bâton de manioc (Bombily, 1995).

Les produits du manioc

Produits locaux consommés surtout en Afrique.

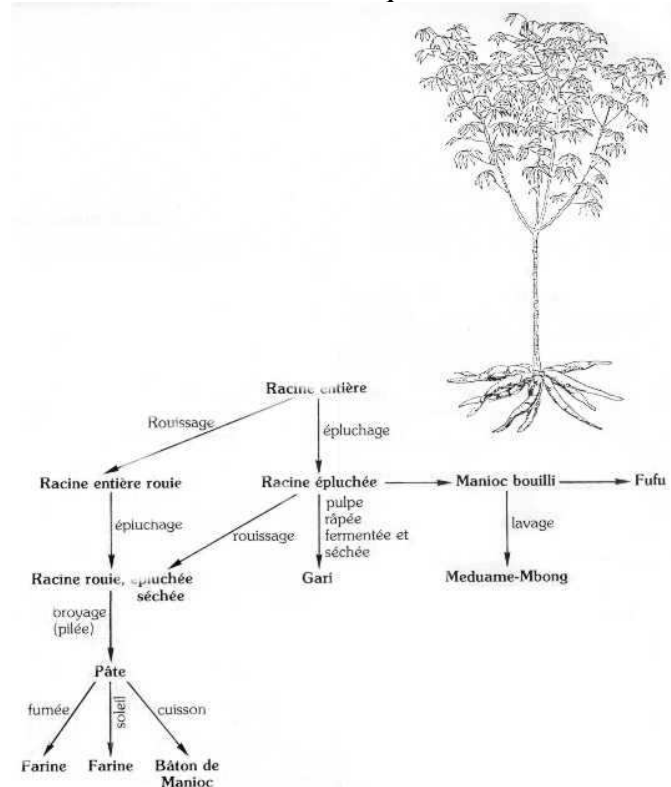


Schéma 1 : Utilisation du manioc selon Laure (1981)

Le rouissage est la fermentation de la racine dans l'eau pendant deux à trois jours (détoxication). Selon les pays, il existe différentes préparations et différentes appellations dont voici quelques exemples :

Le Gari

Partie méridionale

Nigéria: **kpokpogari, lafun, fufu**

Ghana: **gari, kokonte, agbeli kaklo, fufu, ampesi**

Togo: **gari, yakayake, agbeli kaklo**

Gambie: **gari**

Bénin: **gari**

Afrique orientale: **farine de manioc**, pour **uji** et **ugali**

Préparation du gari (très répandu):

Les tubercules lavés et épluchés, sont râpés à la main pour obtenir une pulpe fine. Celle-ci est introduite dans des sacs de chanvre grossier que l'on ferme. Ces sacs sont pressés entre des planches ou des pierres pour éliminer l'excès d'eau et on les laisse reposer pendant trois ou quatre jours pour produire une fermentation (pendant les deux premiers jours de fermentation, on remarque une odeur d'acide cyanhydrique, qui disparaît ensuite). La masse de pâte fermentée est concassée, tamisée grossièrement, mise à sécher. La semoule ainsi obtenue peut être ensuite frite dans un peu d'huile.

Le Fufu

Le terme de **fufu** s'applique à divers produits en Afrique occidentale; en général c'est un aliment pilé ou bouilli pour former une pâte épaisse (fufu à base de manioc bouilli, taro, igname, plantains). Le fufu nigerian est particulier puisqu'il s'agit de manioc fermenté non séché, auquel on ajoute de l'eau froide et que l'on fait cuire jusqu'à formation d'une pâte épaisse.

Le bâton de manioc

Le bâton **de manioc** est constitué par la pâte cuite enroulée dans une feuille de manioc.

En dehors du tubercule, les **feuilles** peuvent être utilisées pour préparer des sauces. Ces feuilles sont riches en minéraux (calcium, phosphore) et beaucoup plus riches en protéines que les tubercules.

Le manioc est également utilisé dans l'industrie pour la préparation de l'amidon, de la fécule, du tapioca, de biscuits, de pâtes alimentaires, de colles, de glucoses, etc.

I-3- Composition du tubercule

Il a une forte teneur en calories: 125 à 140 Kcal pour 100 g de manioc frais et pelé (Bokanga 2001).

Eau: 60 à 70 %.

Glucides: 32 à 35% (amidon surtout).

Protides: 1,5 %.

Cellulose: 3 à 4%.

Lipides: 0,2 à 0,5%.

Le tubercule est surtout constitué de glucides, c'est donc un aliment énergétique. Il apporte beaucoup de calories. Il produit à l'hectare une plus grande quantité de calories que le riz et le sorgho (Laure 1981).

Il est très pauvre en lipides (graisses) et en protides. De plus, ses protides sont dits de mauvaise qualité car ils ne contiennent que très peu de méthionine,

acide aminé indispensable (Laure, 1981). Le tubercule est d'autre part pauvre en substances minérales (calcium, fer, phosphore) et en vitamines (il y en a encore moins dans les produits préparés à partir du tubercule). Il doit donc être associé à des aliments riches en protides et en lipides pour constituer une ration alimentaire équilibrée.

I-4-Apport nutritif du manioc

Le tubercule de manioc possède certains avantages sur le plan nutritionnel: il est riche en calories, et peut être très utile pendant la période de soudure (Nartey, 1978). Cependant, l'extension de sa culture présente de gros inconvénients: Il supprime la faim mais apporte peu de protéines, qui, par surcroît, sont de mauvaise qualité (Laure, 1981). Il provoque donc des malnutritions protéiques. On constate d'ailleurs que les cartes de malnutrition protéique (kwashiorkor) coïncident avec les régions où les enfants sont principalement nourris à base de manioc et de bananes (Bokanga, 2001).

La valeur protéique du manioc est inférieure à celle des autres tubercules (igname, taro), en revanche, la consommation des jeunes feuilles et tiges de manioc (pratiquée à Sumatra, Java et dans d'autres régions asiatiques, mais peu usuelle en Afrique et en Amérique) (Laure, 1981) permet une amélioration sensible de l'équilibre nutritionnel et doit donc être encouragée.

Dans les zones rurales, surtout en Asie, la culture des céréales est remplacée par le manioc car il permet un gain de terres par son rendement à l'hectare. Dans les villes, il est par contre concurrencé par le pain.

I-5 Toxicité du manioc.

Le tubercule frais contient de l'acide cyanhydrique (surtout dans la variété amère) qui est une substance toxique: c'est un poison de l'hémoglobine des globules rouges (Nartey, 1978). De plus, il provoque des troubles de la thyroïde en empêchant l'iode de s'y fixer (goitres, ralentissement de la croissance chez l'enfant ...) (Baena *et al.*, 1997). Ce poison est facilement éliminé par cuisson, séchage au soleil, fermentation (Coon 1969). Il est en quantité plus importante dans l'écorce que l'on élimine lors de la préparation. Par conséquent, lorsque le manioc est bien préparé, il ne renferme plus de trace d'acide cyanhydrique. Cependant, il n'est pas rare d'observer des problèmes de toxicité chronique (mauvais stockage des tubercules, mauvaise préparation).

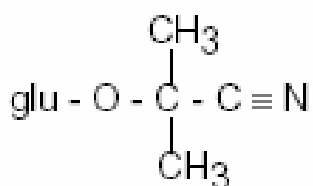


Schéma 2 : Structure chimique de la linamarine

L'acide cyanhydrique se trouve sous forme de composés chimiques qui peuvent être des glucosides cyanogénétiques pour la plupart ou des cyanolipides pour certaines espèces (Poulton 1988). Ces composés sont susceptibles de se

décomposer pour donner par hydrolyse un sucre, une cétone et de l'acide cyanhydrique (Schéma 3) (Nartey, 1978).

Les deux composés identifiés dans le manioc sont la linamarine (Schéma 2) et la lautostraline ; le sucre est un glucose, on parle alors de glucosides. La linamarine est de loin le glucoside le plus important, puisque le rapport linamarine/lautostraline varie de 97/3 à 93/7 (Nartey, 1978). Cinq acides aminés (valine, leucine, isoleucine, phénylalanine, tyrosine) sont les précurseurs de la plupart des glucosides cyanogénétiques connus (Seigler, 1975). Les synthèses de la linamarine et de la lautostraline sont intimement associées aux métabolismes respectifs de la valine et de l'isoleucine (Halkier et Moller 1990 ; Halkier *et al.* 1991). Ces composés jouent un rôle actif dans le métabolisme des plantes (réserves d'acides aminés) mais aussi un rôle de protection efficace vis à vis des prédateurs, des parasites et des micro-organismes. La toxicité du manioc est liée à la présence d'acide cyanhydrique, un inhibiteur de nombreuses réactions enzymatiques entrant dans le métabolisme, en particulier celle du cytochrome oxydase, principal facteur de respiration cellulaire. La dose létale pour un homme adulte est de 50 à 60 mg (Codex Alimentarius Commission, 1988). Les êtres humains comme les animaux, sont capables de détoxiquer une certaine quantité de cyanure dans leurs tissus. Le principal mode de détoxication dans l'organisme fait intervenir une enzyme, la rhodanèse, et des composés soufrés tel que les sulfates ou certains acides aminés notamment ; la méthionine, la cystéine, la

cystine, pour donner des thiocyanates qui sont éliminés dans les urines (Ermans *et al.*, 1972).

Malgré toutes ces possibilités de défense que présente l'organisme humain, on a noté de nombreux cas de pathologies liées à la consommation du manioc cyanogène. En effet au Kiwu dans la région du Bandundu au Zaïre on a noté une forte corrélation entre la consommation du manioc mal détoxiqué, et les maladies comme le Konzo et l'Ebola (Baena *et al.*, 1997). Des études similaires menées en Tanzanie (Mlingi *et al.*, 1993) et au Mozambique (Essers, *et al.*, 1992) attribuent la prévalence du Konzo qui paralyse les populations, à un mauvais traitement du manioc cyanogène.

II BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE DU ROUISSAGE DU MANIOC

II-1- Aspect Biochimique du rouissage du manioc

II-1-1 Dégradation chimique des composés cyanés au cours de la transformation du manioc.

La dégradation des composés cyanés durant les différentes transformations du manioc se déroulerait en deux étapes selon Meuser et Smolnik (1980) :

- La première serait une hydrolyse de la linamarine et de la lautostraline, sous l'action d'une enzyme endogène, la linamarase ou une émulsine (schéma 3). Cette hydrolyse enzymatique se retrouve chez l'ensemble des plantes cyanogènes, et aboutit à la formation d'une cyanohydrine toxique, et à la libération d'un glucose.

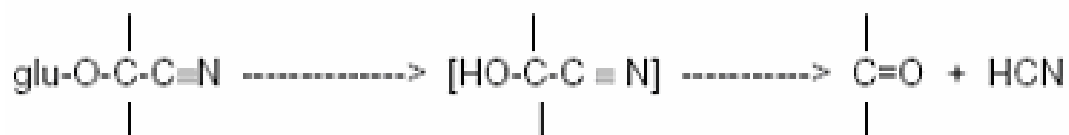


Schéma 3 : Décomposition chimique de la linamarine

Cette hydrolyse n'est malheureusement observée que sur des végétaux endommagés (Nartey, 1981). En effet, les composés cyanogénétiques et la

linamarine se trouveraient localisés dans les vacuoles des cellules tandis que les enzymes hydrolytiques seraient localisés dans les membranes des cellules (Nartey, 1981). Ce n'est qu'après blessure (exemple lorsque l'on pille les feuilles ou alors lorsque l'on épluche les tubercules) que le substrat peut être hydrolysé par l'enzyme. Ces glucosides sont localisés dans les vacuoles du cytoplasme alors que la linamarase est localisée dans la paroi cellulaire (Mpong *et al.* 1990). La linamarase est spécifique de la linamarine mais aussi de la lautostraline (Butler, 1965; Nartey 1968). Elle a son optimum d'activité aux pH compris entre 5.5 et 6 et à une température de 37°C ; elle est relativement stable jusqu'à 72°C (Cooke, Blake, Battershill, 1978).

- la deuxième étape est la dissociation de la cyanohydrine en acide cyanhydrique et cétone (Schéma 3). Cette dissociation peut être chimique ou enzymatique comme l'a suggéré Coon en 1969. Pour ce dernier, la cyanohydrine est hydrolysée par une seconde enzyme, une hydroxynitrilyase. Cette réaction enzymatique est analogue aux mécanismes mis en évidence pour la dihurrine du sorgho. L'étude de la stabilité de la cyanohydrine à différents pH (Cooke, Blake et Battershill 1978) montre qu'elle est relativement stable en milieu acide, l'équilibre entre l'acide cyanhydrique et la cyanohydrine s'instaurant pour un pH voisin de 5,5.

Le cyanure responsable de la toxicité du manioc se trouverait dans les tubercules et ses dérivés sous deux formes principales :

- une forme liée, à l'état de glucosides (linamarine et lautostraline)

- des formes libres à l'état de cyanohydrine et d'acide cyanhydrique.

Nartey, (1978) indique que ces formes toxiques pour l'homme, peuvent être éliminés soit par :

- dissolution dans l'eau pour les formes liées
- évaporation pour les formes libres.

On comprend ainsi l'intérêt des différents traitements traditionnels qui incluent la macération, le rouissage, la fermentation, le trempage, l'ébullition, la cuisson, séchage...etc. Appliqués seuls ou combinés, ces procédés visent à réduire le contenu en cyanures des différentes préparations de manioc. Ceci en essayant de favoriser l'hydrolyse des composés cyanogénétiques et l'élimination des cyanures formés. L'action des micro-organismes ne serait pas négligeable.

II-1-2 Ramollissement des tubercules au cours du rouissage.

Le ramollissement du manioc est dû à la lyse de certaines parois des cellules végétales de racines, composées principalement de pectine et de cellulose (Okafor *et al.*, 1984). La présence d'activités pectinolytiques importantes et l'absence d'activité cellulolytiques indiqueraient que les premières sont à l'origine de ce ramollissement (Ampe et Brauman 1995). Les pectinases détectées sont composées de trois enzymes (pectine hydrolase, pectatylase et polygalacturonase) dont l'origine végétale et bactérienne a été depuis précisée (Ampe *et al.*, 1994). La présence de pectine hydrolase détectée au cours du rouissage a déjà été mentionnée dans le cas d'une fermentation traditionnelle

(Oyewole et Odunfa, 1990) ou de l'inoculation artificielle du manioc par des *Corynebacterium spp.* (Okafor *et al.*, 1984). Le fait que le ramollissement débute le deuxième jour du rouissage dans des conditions acides et anoxiques indique que les bactéries, à l'origine de ce phénomène, sont aérobies strictes ou facultatives et acido tolérantes. L'isolement récent de Clostridies et *Bacillus pectinolytiques* corrobore cette hypothèse et contredit celle d'Okafor *et al.*, (1984) qui impute l'origine du ramollissement aux *Corynebacteriums*. Le ramollissement du manioc lors du rouissage se produirait par la dissociation des fibres de cellulose de leur ciment pectique due à l'action d'enzymes telles que les hydrolases et les lyases sur les liaisons osidiques des pectines.

II-2 Rôle des micro-organismes dans le rouissage du manioc

II-2-1 Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques constituent un ensemble de micro-organismes capables de transformer des sucres simples comme le lactose ou le glucose en acide lactique (Nout *et al.*, 1989). Leur importance, découle de leur habilité à découpler leur croissance cellulaire de la transformation des sucres en lactate, et de poursuivre cette bioconversion bien au-delà de la phase de multiplication cellulaire (Larpent et Larpent Gouraud, 1985). Ceci est un point important à souligner, car cela explique que même dans des milieux non optimisés, ces bactéries exigeantes en acides aminés et source d'azote organique, peuvent réaliser des bioconversions pondérales importantes (Law, Lapointe, et Valade,

1983). En plus de leur rôle dans la production des acides organiques, les bactéries lactiques ont un potentiel enzymatique énorme ce qui d'ailleurs leur confère une importance en industrie.

Rôle des bactéries lactiques sur les qualités organoleptiques et thérapeutiques du manioc transformé.

Les bactéries lactiques permettent d'améliorer les caractéristiques alimentaires des produits fermentés. Ceci en développant les qualités organoleptiques par formation d'acide lactique, d'acétoïne, d'acétaldéhyde, diacétyl, de peptides et d'acides aminés. Ces composés seraient des précurseurs d'arômes, qui se développent lors des étapes ultérieures des procédés de fabrication de certains produits. Abe et Lindsay (1978) ont montré que le micro-organisme intervenant principalement dans la fermentation est *Streptococcus faecium* qui produit les composés volatiles responsables de la flaveur du gari (acétaldéhydes, éthanol, acétone et di acétyl). Le rôle capital des bactéries lactiques lors de la fermentation en milieu solide de l'amidon du manioc sur le pouvoir de gonflement des farines d'amidon aigre n'est plus à démontrer (Chuzel, 1990). Il a en outre été prouvé que la fermentation lactique poussée et d'une durée relativement longue, de même que la présence de l'acide lactique en quantité suffisante sont indispensables à l'obtention d'une farine alimentaire, de meilleure qualité (Chuzel, 1990)

Rôle des bactéries lactiques sur la stabilité, la conservation et la qualité hygiénique du manioc fermenté

Giraud *et al.*, (1994) ont réussi à isoler une souche nouvelle de *Lactobacillus plantarum* A6 (homolactique), capable, de se développer en milieu amidonné et de transformer directement l'amidon de manioc en acide lactique dans des conditions de pH contrôlé. Ceci est important non seulement du point de vue écologique pour les fermentations traditionnelles du manioc, mais également pour la fabrication industrielle d'acide lactique à partir d'amidon de manioc sans traitement thermique. Cela simplifierait considérablement le procédé de production des acides organiques à partir du manioc. Dans les processus de fermentation naturels, il n'y a pas de traitement thermique de l'amidon de manioc, qui se trouve donc dans sa forme native d'amidon cru. Les résultats obtenus montrent donc que ce type de bactérie lactique est tout à fait capable de réaliser la transformation de l'amidon brut en acide lactique dans des conditions naturelles. La durée de conservation des produits serait augmentée grâce à la présence d'acide lactique, et dans certains cas d'acide acétique (Ampe *et al.*, 1994). Ceci limiterait considérablement le développement des micro-organismes indésirables ou pathogènes par leurs propriétés antiseptiques reconnues, et par la diminution du pH (Brauman *et al.*, 1995). Pour que l'action stabilisatrice soit efficace, il faut que l'acidification soit rapide et qu'en moins de 24 heures, le pH s'abaisse en dessous de 4,0. On constate parfois une diminution du pH limité en raison des conditions dans lesquelles se déroule la fermentation (température,

accessibilité du substrat, effet tampon du milieu). On sait aussi que le pH de stabilisation varie selon la nature du produit fermenté (lait, ensilage, choux...) (Okafor, 1977). Si l'acidification initiale n'est pas assez rapide, certains germes pathogènes ou indésirables peuvent se développer partiellement, se maintenir et faire dévier ou évoluer ultérieurement le produit, pendant la période de conservation. Pour cette raison il est recommandé de s'assurer que la phase initiale d'acidification est suffisamment rapide pour assurer une bonne qualité microbiologique du produit. L'effet antiseptique des acides lactique et acétique est lié à leur forme dissociée qui leur permet d'entrer dans les cellules bactériennes où ils s'ionisent et s'accumulent sous forme de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), autre antiseptique puissant contre les germes pathogènes intestinaux (Perdigon *et al.*, 1990). Svanberg *et al.* (1990), Svanberg (1991a et 1991b) ont réalisé des études spécifiques concernant l'effet de la fermentation lactique sur la diminution de *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Shigella dysenteriae*. Les implications sur l'état de populations d'enfants alimentés avec des produits amylacés après fermentation lactique indiquent des effets très positifs de la fermentation lactique sur la diminution des risques de diarrhées chez ces populations infantiles Svanberg (1991a et 1991b).

Les bactériocines sont des protéines de petite taille ou des peptides ayant des activités biologiques bactéricides ou bactériostatiques (Nout, 1989). La biosynthèse de ces bactériocines semble assez commune chez les bactéries

lactiques. Des études ont montré que des bactéries peuvent synthétiser des bactériocines actives non seulement contre d'autres bactéries lactiques, mais également contre d'autres bactéries gram+, et selon certains, contre des bactéries gram-, parmi lesquelles on rencontre des entérobactéries et germes pathogènes (Shaack et Marth 1988, Nout *et al.*, 1989 et Spelhaug et Harlander 1989). Récemment des études sur les bactéries lactiques productrices de bactériocines, se sont développées en raison de l'effet très marqué de la nisine, une des bactériocines les plus étudiées et aux effets reconnus sur les germes pathogènes du Groupe des *Listeria monocystogènes* (Giraud *et al.*, 1995). Des recherches actuelles sur la bioconversion du manioc s'orientent sur la recherche des bactéries lactiques ayant une activité forte sur les entérobactéries et potentiellement importante pour un usage prophylactique en alimentation infantile (Giraud *et al.*, 1995).

II-2-2- Les champignons (levures et moisissures)

- Les levures :

Les levures sont des champignons unicellulaires pour tout ou partie de leur cycle végétatif. Certaines sont connues depuis plus d'un siècle pour leurs potentialités fermentaires vis à vis de l'amidon de manioc (Chuzel, 1990). Il s'agit d'un groupe hétérogène qui d'un point de vue taxonomique, comprend une trentaine de genres et près de 200 espèces (Kreger-Van Rij, 1984) fermentant l'amidon de manioc.

Les levures utilisent préférentiellement les sucres fermentescibles du tubercule du manioc notamment les di-, tri-, ou polysaccharides après hydrolyse. L'invertase extracellulaire hydrolyserait le saccharose en glucose et fructose. Le glucose libéré pénétrerait dans la cellule par diffusion facilitée mais aussi après phosphorylation (Frankel, 1982). Les hexoses ainsi assimilés sont intégrés dans la voie de la glycolyse après phosphorylation par deux hexokinases et une glucokinase (Frankel, 1982). La teneur en enzymes intracellulaires va conditionner les performances physiologiques de levures, notamment la teneur en protéines totales et en glucosides cyanogénétiques résiduelles du dérivé du manioc fermenté par la levure. On obtiendrait ainsi des chiffres allant de 30 à 65% de la teneur totale en protéines cellulaires au cours de la production du gari (Dufour *et al.*, 1995). Westby et Twiddy (1992) utilisant des souches de *Saccharomyces cerevisiae* comme levain, ont indiqués des résultats significatifs concernant l'abaissement considérable du taux de glucosides cyanogénétiques et de résidus cyanés dans la farine de céréales notamment la farine de Sorgho (Esser et Nout, 1989). Okafor en 1977, et Ejiofor et Okafor (1981), indiquent la présence des *Candida* dans l'achèvement des processus de dégradation des composés cyanés. Leur prédominance en fin de fermentation pourrait expliquer leur présence sur des cossettes.

- Les moisissures :

Esser et Nout (1989) indiquent la prédominance des moisissures au cours de la fermentation sauvage du manioc et affirment qu'elles seraient responsables

de la couleur sombre du produit fini. Les moisissures isolées de ces produits étaient principalement *Rhizopus spp.*, *Mucor spp.*, *Penicillium spp.* et *Fusarium spp.* Collar et Lévy en 1959 ont noté la prédominance de l'espèce *Geotricum candidum*, en fin de fermentation. Celui-ci intervenant après l'action des *Corynebacterium manihot*, pour achever la dégradation des glucosides notamment favorisée par l'abaissement du pH et qui acidifierait encore plus le milieu et favoriserait la production des cétones, des aldéhydes, et des esters. Oyewole et Odunfa (1992) ont révélé que certaines souches de moisissures entrant dans la fermentation du manioc et plus précisément *Aspergillus sydowi* et *Fusarium esquiseti* produisent la linamarase responsable de l'hydrolyse des glucosides cyanogénétiques. Outre leur rôle dans la détoxification, ceux-ci pourraient également intervenir dans l'amélioration des qualités organoleptiques, par la production des acides, cétones, aldéhydes, esters... En effet, les racines tubéreuses de manioc peuvent, moyennant un certain degré d'humidité, subir une fermentation sèche ou fermentation à l'air libre. Cette fermentation aboutit à la réduction du taux de cyanures des cossettes et à l'élaboration des propriétés organoleptiques de la farine et autres pâtes (fufu) produites de cette manière (Oyéwolé et Odunfa, 1992). L'importance des moisissures dans le processus de fermentation a été établie (Yandju, 1989). Les espèces *Mucor muceolo*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* LINK, *Aspergillus niger*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavipes* et *Aspergillus sparsus*, ramollissent

les tubercules ce qui peut entraîner dans certains cas la séparation de l'amidon des fibres.

II-3 Etude biochimique du rouissage traditionnel des racines de manioc

Le rouissage du manioc est une fermentation lactique spontanée, effectuée principalement en Afrique centrale (Brauman *et al.*, 1995). Elle est hétérolactique et assez complexe, avec intervention d'une microflore complexe d'espèces bactériennes (bactéries lactiques, *Clostridies spp...*etc) et probablement *Bacillus spp* ou *Klebsiella spp*. (Ogunsa, 1980 ; Okafor *et al.*, 1984 ; Ayernor, 1985, Brauman *et al.*, 1995).

Le procédé consiste à immerger dans de l'eau des racines de manioc, entières ou prédécoupées, pendant trois à cinq jours. Durant cette fermentation, les glucosides cyanogénétiques endogènes sont dégradés, les produits qui participent au goût du produit sont élaborés et les racines ramollies (Okafor *et al.*, 1984 ; Tinay et Beerens, 1984 ; Oyéwolé et Odunfa, 1990 ; Ampe *et al.*, 1994). En Afrique Centrale, ces racines rouies sont principalement transformées en fofou (farine de manioc) ou Chikwangué; (Trèche et Massamba, 1995).

Les principaux phénomènes biologiques et physico-chimiques de cette fermentation sont assurés par une microflore sauvage dont la composition serait gage de l'aspect du produit final (Raimbault, 1995).

Cette microflore est constituée de bactéries fermentaires anaérobies facultatives, parmi lesquelles, après deux jours de fermentation, les bactéries

lactiques deviennent majoritaires (Oyewole, 1990). Les levures comme les *Candida spp.* ne semblent pas jouer un rôle significatif dans le rouissage mais leur importance croissante dans les derniers stades du procédé pourrait influencer la conservation du produit final (Okafor, 1977). Le pH de l'eau de rouissage se stabilise après 48 heures autour de 4,5 (Brauman *et al.*, 1995). Cette acidification serait due à la production d'acides organiques, principalement le lactate, par les bactéries lactiques (Brauman *et al.*, 1995). La pression en oxygène dissous baisse très rapidement jusqu'à 0,2mg/l ce qui permet l'installation d'une microflore anaérobie stricte telle que les Clostridies, qui produisent du butyrate (Giraud *et al.*, 1995). La microflore fermentaire utiliserait comme substrat carboné principal, les oligosaccharides (sucrose, glucose et fructose) de la racine (Okafor, 1977).

Au niveau de la racine, le rouissage se caractérise par trois transformations essentielles :

- Une dégradation des composés cyanés endogènes de la racine (la concentration décroît de 400ppm dans la racine fraîche à 20 ppm dans la racine rouie) ;
- Une lyse importante des parois végétales due à l'action combinée de plusieurs pectinases (pectinemethylesterase et pectate lyase) ;
- La production d'acides organiques (C2 à C4), principalement du lactate et du butyrate qui participent au goût caractéristique des produits finaux : Chikwangue et Foufou.

III PRODUCTION ET CONSERVATION DES MICRORGANISMES

III-1- Production de la biomasse.

Les microorganismes, en raison de leurs propriétés métaboliques, sont depuis fort longtemps utilisés par l'homme pour améliorer les propriétés alimentaires des produits fermentés (Vlanou, 1985).

La production de biomasse vise plusieurs objectifs dont :

- l'obtention des microorganismes;
- la production de composés sécrétés par les microorganismes comme les enzymes, les pigments, ou les toxines ;
- la production des métabolites comme les antibiotiques, les vitamines ou les amino-acides ;
- la transformation biochimique de composés définis comme celle de certains stéroïdes ou du sorbitol pour la synthèse de l'acide ascorbique.

III-1-1 Production des bactéries

Les travaux de Roberts (1985) ont montré la possibilité d'utiliser pour compléter la nourriture des animaux des cellules bactériennes séchées, notamment celles de *E.coli*, qui contiennent un taux élevé d'aminoacides

renfermant du soufre (méthionine). Ces acides aminés seraient à un taux assez bas dans les protéines d'origine fongique.

Toutefois, l'utilisation des protéines bactériennes pour l'alimentation animale a induit l'optimisation des procédés traditionnels de production. On utilise ainsi des fermenteurs et notamment l'utilisation des cultures agitées, pour la production de diverses bactéries notamment des bacilles lactiques destinées au réensemencement de la flore intestinale après traitement par les antibiotiques et même la culture des bacilles lactiques destinés à la fabrication du yaourt et autres laits fermentés. Pour ces productions, les anciennes méthodes de culture en ballon ou en fioles de Roux ont cédé la place aux méthodes de culture aérées et agitées, en cuve profonde maintenant classiques pour la croissance des microorganismes aérobies (McLennan, 1965). Les méthodes de culture continue sont actuellement utilisées pour la production des cellules bactériennes avec des rendements élevés en biomasse (Malek, 1986). De plus la séparation des cellules microbiennes a bénéficié des perfectionnements des méthodes modernes de filtration et de centrifugation.

III – I -2 Production des levures

Il convient de rappeler, en premier lieu, que les diverses espèces de levures ont été, depuis longtemps déjà, l'objet d'applications importantes dans les industries alimentaires, notamment pour la production de levures de boulangerie, pour la fabrication de la bière, pour la fermentation alcoolique (Vlanou, 1985).

L'obtention de quantités importantes de levures, au cours de la fabrication de la bière, a fait rechercher une utilisation de ce sous produit. Les travaux de Braude (1942) et de Reuser et Spencer (1957) ayant montré la richesse de ces microorganismes en aminoacides essentiels, notamment en lysine et en vitamines du groupe B, une expérimentation sur l'animal a précisé l'intérêt d'utiliser ces microorganismes comme supplément alimentaire (Reuser et Spencer, 1957).

Les principaux impératifs auxquels devraient répondre les souches utilisées dans ce but, selon Braude (1942) sont les suivants :

- Croissance vigoureuse ;
- Possibilité d'utilisation des substrats variés ;
- Rendements élevés ;
- Résistance aux contaminations;
- Résistance aux composés toxiques ;
- Croissance à température élevée.

Les exigences nutritives et les composants des milieux de culture des levures sont aujourd'hui parfaitement connus et outre ces besoins nutritifs, les levures exigent pour leur développement de l'oxygène. C'est pourquoi l'on recommande dans le but d'obtenir une biomasse importante, une aération énergique et une introduction de substrats sucrés, de manière à éviter l'oxydation rapide de ce dernier qui conduirait à la production d'alcool.

Les procédés mis en œuvre pour la production des levures appartiennent à deux types (Vlanou, 1985) :

- les procédés de production en cuves qui sont les plus anciens et qui ont atteint un très haut degré de perfectionnement.
- les procédés continus qui supplantent actuellement les procédés en cuves et qui sont, en fait, un perfectionnement de ceux –ci.

III-I-3 Production des moisissures

Les moisissures cultivées sont utilisées pour l'alimentation humaine depuis le XVIIIème siècle. Vu leur importance comme source de protéines et de vitamines, des études concluantes, ont montré la possibilité de produire en cuves le mycélium de divers champignons (Hunfeld et Suhgihara 1982 ; Block *et al.*, 1983). La production est réalisée en 72 heures, en cuves aérée et agitée de 75 m³ sur milieu nutritif ne contenant que des sucres et des éléments minéraux (Block *et al.*, 1983).

III-2 Généralités sur la conservation des micro-organismes.

Il existe un large éventail de méthodes de conservation de micro-organismes et il est difficile de choisir une méthode pour un travail particulier. Toutes les méthodes ont leurs avantages et inconvénients particuliers. Le choix de la méthode pour une utilisation particulière est souvent déterminé en rapprochant les particularités de méthode conformément aux besoins de l'utilisateur. Malheureusement, les problèmes d'identification ou de taxonomie et de classification d'un microorganisme ou spéciation sont rendus très difficiles, car

les cultures successives, pratiquées selon les méthodes de la bactériologie classique, entraînent presque toujours des variations plus ou moins importantes des caractères du génotype (perte du pouvoir producteur, modification des caractères morphologiques, apparition ou disparition d'organites) (Roberts, 1985). Cette propriété particulière qu'ont les microorganismes de subir, au cours des repiquages, de telles transformations ou variations entraîne, du point de vue industriel, un énorme inconvénient. C'est la raison pour laquelle, en microbiologie, les méthodes classiques de transferts répétés sont abandonnées et des méthodes de conservation convenables des souches et la stabilisation des propriétés de ces microorganismes sont mises au point avec comme préoccupation constante le maintien de la vigueur de ces souches (Harrigan et Cance, 1976).

Trois méthodes particulières sont surtout employées, mais aucune n'est universelle. Seule l'expérience permet de déterminer celle qui s'adapte le mieux aux organismes dont on veut assurer la conservation :

III-2-1- La conservation à l'huile de paraffine

Cette méthode décrite par Larpent et Larpent-Gouraud (1985) consiste, après sélection sur un milieu solide ou liquide, tamponné pour éviter l'acidification, à cultiver le microorganisme dans les meilleures conditions de température, de manière à obtenir des germes en phase de croissance logarithmique et, dans le cas de microorganismes sporulés, des spores abondantes

et parvenues à maturité. La culture ainsi obtenue est recouverte d'une couche d'huile de paraffine d'environ 10mm d'épaisseur. La présence d'huile évite l'évaporation de l'eau, ce qui empêche donc toute variation de la concentration en substances dissoutes et toute variation de la pression osmotique, dangereuse pour la vie du microorganisme (Larpent et Larpent-Gouraud, 1985). D'autre part, le joint formé par l'huile ne permet qu'une diffusion très lente de l'oxygène de l'air dans la culture et le repiquage de la souche n'entraîne pas la destruction de la souche-mère (Harrigan et Cance, 1976). Les souches ainsi traitées sont stockées au réfrigérateur à + 2°C et peuvent conserver leurs propriétés pendant plusieurs années.

III-2-2- La lyophilisation

Elle consiste à porter rapidement à – 20°C un petit volume de suspension de germes, placés dans un tube de verre de petit diamètre et à dessécher sous vide de l'ordre de 1/20 de mm de Hg, en fixant la vapeur d'eau par un piège à air liquide ou à neige carbonique. Le tube de verre ainsi soumis à la lyophilisation est alors scellé sous vide et conservé au réfrigérateur pendant une durée de 1 à 20 ans (Buttiaux, Beerens et Taquet, 1974). Ce procédé présente de nombreux avantages: La destruction des protéines et des enzymes des microorganismes est réduite au minimum à cause de la rapidité du séchage et la concentration indésirable des substances en solution est évitée par cette réfrigération rapide. Enfin l'emploi d'un vide poussé prive d'oxygène l'atmosphère du tube.

Afin d'augmenter les chances de survie des germes au cours de l'opération, on ajoute à la suspension des colloïdes protecteurs tels que le lait, le sérum, le blanc d'œuf, de la peptone, de la mucine ou des sucres. En effet, au cours de la lyophilisation, un grand nombre de microorganismes sont tués mais la proportion de survivants qui varie entre 5 et 30% du chiffre initial, permet après addition d'eau stérile au lyophilisat, une mise en culture de microorganismes ayant conservés toutes leurs facultés de croissance et leurs propriétés métaboliques. Cependant, cette opération entraîne malheureusement la destruction de la souche mère.

III-2-3- La stabilisation sur terre (stock soil culture)

Méthode la plus simple de toutes les méthodes de conservations de microorganismes, elle s'applique surtout à la conservation des *Streptomyces* et de certains *fungi* possédant des spores.

Dans ce procédé, décrit par Harrigan and Cance, (1976) on utilise de la terre de jardin, mélangée à 20% avec du sable et 1 à 2% de carbonate de calcium. Après tamisage, ce mélange est placé dans des tubes à essai à larges ouvertures, à raison de quelques grammes par tubes et on stérilise à l'autoclave, 8 à 15 heures à 130°C ou plusieurs stérilisations de 2 à 3 heures à cette même température. L'addition d'une petite quantité d'eau dans le tube, avant la stérilisation, permet d'obtenir un meilleur séchage du mélange de sol stérile. Après évaporation de l'eau par passage au dessiccateur à vide, en présence d'un agent desséchant, les

tubes sont bouchés au coton et paraffinés ou scellés. Grâce à ce procédé, on assure la conservation convenable des microorganismes pendant une longue période qui peut atteindre 20 années.

III-2-4- Maintenance de viabilité

Le mort de la cellule peut survenir pendant le traitement de conservation et il peut y avoir de nouvelles pertes pendant le stockage, en fin de compte on peut avoir des niveaux assez bas de viabilité (Roberts, 1985). Pour éviter la perte de la culture il doit être resoumis au processus de conservation. La méthode employée doit réduire au minimum la perte de viabilité pendant le traitement et le stockage pour que les cultures une fois préservées survivent pendant longtemps.

III-2-5- Changement de population par sélection

Une proportion des cellules dans une population peut mourir pendant le processus de conservation initial et cela peut paraître non significatif à l'utilisateur si des fortes concentrations de cellule sont utilisées. Cependant, la réduction du nombre de cellules viables peut résulter du choix d'une population résistante de cellules survivantes et présenter la possibilité de changement des caractéristiques de la culture préservée (Ludwik *et al.*, 2003). La méthode de conservation doit donc conserver le nombre le plus grand de cellules viables pour que la population survivante soit identique à l'originale aussi près que possible.

IV- MISE AU POINT DE STARTERS DE FERMENTATION DU MANIOC

Quatre microorganismes différents (*Bacillus subtilis*, *Klebsiella spp.*, *Lactobacillus plantarum* et *Candida krusei*) ont été utilisés comme ferments pour le rouissage des tubercules stériles de manioc cyanogènes (Oyewole, 1990). Le rôle de chacun des starters utilisés a été dégagé comme étant principalement l'acidification. Le plus fort taux d'acide produit a été obtenu par la souche de *Lactobacillus plantarum* alors que les tubercules inoculés par *Baccillus subtilis* ont indiqué les plus forts taux de ramollissement (Oyewole, 1990). Cependant, les tubercules inoculés par chaque starter en culture pure, ont induit un ramollissement meilleur par rapport à une fermentation naturelle. Les saveurs caractéristiques du manioc fermenté ont été obtenues avec la souche de *Candida crusei*. Parmi les microorganismes utilisés au cours de cette étude on a observé aussi bien des activités spécifiques que complémentaires au cours de la fermentation. Dans le même sens, *Lactobacillus plantarum* (GL 721) producteur de linamarase et amylolytique, a été utilisée comme starter en culture pure sur des tubercules de manioc stériles (Oyewole et Odunfa, 1991). Les résultats obtenus ont indiqué une nette amélioration du degré d'acidification, par rapport à une fermentation naturelle après 36 heures seulement de rouissage.

Chapitre 2

SCREENING DES MICROORGANISMES A POTENTIALITÉS FERMENTAIRES POUR LE MANIOC

I- Introduction

L'amélioration de l'étape de la fermentation du manioc débutera par l'isolement des microorganismes à utiliser comme ferment. Le problème majeur de l'ensemble des starters mis au point ultérieurement est qu'elles sont constituées de microorganismes venant d'autres milieux écologiques, ou isolés d'autres substrats (Oyéwolé, 1990, Ofuya et Najiorfor, 1989) ou issus de manipulations génétiques (Giraud *et al.*, 1995). Or le changement du substrat a un impact sur la colonisation du nouveau substrat l'adaptation à ce dernier n'étant pas toujours évidente (Block *et al.*, 1983). Dans le cas de notre travail le substrat amidon de manioc est la source indiquée pour la recherche de ce type de microorganismes. Brauman *et al.*, (1995) ont signalés l'utilisation de cossettes de manioc séchées dans certaines zones rurales d'Afrique comme ferment pour accélérer la fermentation naturelle du manioc. Ce procédé particulier observé consiste à introduire des cossettes de manioc fermenté au début d'une fermentation naturelle. La durée du temps de fermentation est alors ramenée à trois jours au lieu de cinq jours normaux Brauman *et al.*, (1995).

Il se pourrait donc que des microorganismes ayant de fortes habilités à transformer le manioc cyanogène et capables de résister aux étapes de séchage sur amidon de manioc comme support puissent être isolés d'un tel milieu.

D'autre part des études ont montrés que l'intervention des microorganismes au cours de ces procédés fermentaires se fait surtout par voie d'exo enzymes (Saucedo *et al.*, 1990, Sokari *et al.*, 1991). Ces exo enzymes étant surtout : l' α -amylase, la β -glucosidase et des cellulases (Giraud *et al.*, 1992). En effet, la production des α -amylases par les microorganismes à activité amylasiques, contribuent à la dégradation et à la transformation de l'amidon endogène en sucres métabolisables par les bactéries (Giraud *et al.*, 1992, Kéléké Kimpolo et Brauman, 1995). Les bactéries productrices de β -glucosidase, enzyme capable de dégrader les glucosides cyanogénétiques au cours d'un rouissage contrôlé du manioc, participent aux processus de dégradation de la linamarine endogène et contribuent ainsi à la détoxification du manioc au cours de la fermentation naturelle (Brauman *et al.*, 1995, Agbor Egbe *et al.*, 1995). Enfin, les pectinases contribuent au ramollissement de la pulpe de manioc en fermentation (Ampe, Kéléké, Robert et Brauman, 1995). Malheureusement, cette activité enzymatique réelle des microorganismes au cours de la fermentation demeure encore controversée (Amund et Ogunsu, 1987, Giraud *et al.*, 1991) car non encore évaluée quantitativement. Il se pourrait que parmi les microorganismes présents dans le manioc, certains soient capables de produire en quantité suffisante, les enzymes nécessaires à la bioconversion des tubercules de manioc.

Les objectifs de cette première partie du travail, seront de trouver une ou plusieurs souches qui répondraient le mieux aux différents critères sus énumérés, et réaliser une évaluation quantitative de la production des enzymes par quelques-uns de ces microorganismes les plus intéressantes.

II- Matériel et méthodes

1- Echantillonnage

Les isollements ont été réalisés à partir des cossettes de manioc séchées, achetées sur les marchés locaux à savoir Ngaoundéré, Meiganga, Batouri, Bamenda, Obala, Nkongsamba et Tibati (IRA, 1987). Environ 2 kg de cossettes ont été prélevés à l'étalage de vente de manière aléatoire et introduite dans des sachets en plastics. Les échantillons ainsi réalisés ont été emmenés rapidement au laboratoire pour analyses.

L'évaluation de la production des enzymes par les microorganismes est réalisée sur du manioc de variété TMS 2425 cyanogène. Ces tubercules ont été fraîchement prélevés dans les champs d'expérimentations de l'IRAD (Institut de Recherche Agronomique pour le Développement) Centre Régional de Ngaoundéré. Les tubercules délicatement déterrés ont été introduits dans des sacs en plastique tressés puis rapidement transportés au laboratoire pour utilisation.

2- Isolement des micro-organismes.

2-1 Milieu d'isolement

Environ 1kg de cossettes a été prélevé de manière aléatoire sur les marchés énumérés un peu plus haut, à l'étalage de vente. Des lots de 100 g ont été réalisés puis chaque lot introduit dans environ 900 ml d'eau peptonée stérile. Les échantillons ainsi préparés ont été agités vigoureusement manuellement, jusqu'à désagrégation complète des cossettes de manioc dans le liquide de dilution de manière à avoir une solution laiteuse. Cette solution a été ensuite placée au bain-marie sous agitation à 30°C pendant 18 heures, afin de permettre une revivification des micro-organismes.

2-2 Isolement

Les analyses microbiologiques ont été réalisées sur ces échantillons par les méthodes classiques de dénombrement après dilutions décimales (Buttiaux *et al.*, 1974).

Les bactéries lactiques ont été isolées sur milieu gélosé MRS dans la masse, tel que décrit par Sharpe *et al.* (1966). Les boîtes ont été incubées à 32°C pendant 24 à 48 heures. Les colonies isolées ont été soumises aux observations microscopiques à l'état frais puis à l'état coloré (au Gram). Un test à la catalase à l'aide de l'eau oxygénée a été réalisé.

Les levures et moisissures ont été isolées sur milieu gélosé de Sabouraud et PDA respectivement, l'ensemencement a été réalisé en surface par stries transversales et les boîtes incubées à 30°C pendant 24 à 72 heures (Harrigan et Mc Cance, 1976). Les colonies bien isolées ont subi une coloration au bleu de méthylène et des observations de la morphologie ont été entreprises au microscope à l'objectif X 40. Les Bacilles gram positifs et catalase négative (Caractéristique différentielle de base des genres *Lactobacillus*), de même que les champignons présentant des spores, des filaments mycéliens ont été retenus pour la suite du travail.

3- Sélection des micro-organismes : Production qualitative des enzymes.

3-1 Sélection des micro-organismes à activité amylolytique.

La recherche des micro-organismes amylolytiques a été réalisée sur les souches précédemment isolées, selon les méthodes décrites par Olukoya, (1995). Les *Lactobacillus* productrices d'amylases ont été sélectionnées par repiquage des colonies de bacilles gram positif et catalase négative, sur milieu MRS additionné d'amidon soluble à 1% et d'actidione à 0,025g/l comme inhibiteur de champignons, susceptibles de se développer sur MRS (Harrigan et Mc Cance, 1976). L'incubation a été réalisée à 30 °C pendant 48 heures. Les levures et moisissures amylolytiques ont été sélectionnées sur milieu PDA additionné

d'amidon soluble à 1% et de Chloramphénicol à 0,05g/l, comme inhibiteur de bactéries. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24 à 72 heures.

Après incubation, une solution de lugol a été vaporisée à la surface de toute la boîte, et les colonies à halo clair au pourtour ont été retenues, et considérées comme productrices d'amylases (Olukoya, 1995) (photo 4).

3-2 Sélection des micro-organismes à activité β -glucosidase

La recherche des micro-organismes producteurs de linamarase a été réalisée par ensemencement des isolats purifiés sur milieu gélosé MRS, ou Sabouraud additionnés de linamarine à 1% et de picrate alcalin à 0,01%, comme capteur de cyanure libéré (Okafor et Ejiorfor, 1986). 10 ml de milieu sont introduits dans des tubes à vis de 40. L'ensemble est stérilisé et refroidi à température ambiante jusqu'à la prise en masse. Les microorganismes sont alors ensemencés dans la masse par piqûre centrale. Après 48 heures d'incubation à 32°C pour les *Lactobacillus* et 72 heures à 30°C pour les levures et moisissures, les tubes présentant un développement de coloration noire au pourtour de la piqûre centrale ont été considérés comme à activité β -glucosidase (photo 3).

3-3 Sélection des micro-organismes à activité pectinolytique

Le screening des micro-organismes producteurs de pectinases a été réalisé selon la procédure de Brisou (1971) telle que modifiée par Starr *et al.*, (1977). Cette méthode a été encore modifiée en utilisant de la gélose MRS sans glucose et

extrait de viande pour les *Lactobacilles* ou du PDA sans glucose pour les levures et moisissures, mais en utilisant 14g/l de Pectine (Grindsted RS 4006 DM 74 % de pureté) et du bleu de bromothymol à 0,05 %, comme indicateur coloré. Les milieux ont été stérilisés à 121°C pendant 15mn avant utilisation.

4 Identification

Les souches montrant de réelles caractéristiques à produire un ou plusieurs des enzymes recherchées à savoir les amylases, les pectinases, et la linamarase, ont été sélectionnées et repiquées en tubes dans environ 15 à 20 ml de bouillon MRS, incubé à nouveau à 30°C pendant 24 à 48 heures pour les bactéries lactiques, et sur milieu PDA incubé à 30°C pendant 48 à 72 heures pour les levures et moisissures (Harrigan et Mc Cance, 1976). Les identifications ont été réalisées à partir des isolats conservés au frais sur gélose inclinée. Les analyses suivantes en vue de leur identification ont été conduites :

- Examen microscopique, pour vérification de la pureté et la morphologie des souches) ;
- Mobilité ; Formation de spores ;
- Test à la catalase (test confirmatif du screening primaire) ;
- Coloration de Gram (test complémentaire au screening primaire);
- Incubation à 15°C, 20°C, 30°C et 45°C ;
- La fermentation de diverses sources de carbone (profil fermentaire), a été réalisée sur les mêmes souches purifiées, à l'aide des galeries API (API 5030

strips Biomerieux France, pour les levures et moisissures, et API 50 CH N° 5030 strip, Biomerieux charbonnière, bains France pour les *Lactobacillaceae*). Chaque souche a été identifiée selon le schéma discriminatoire de Kandler et Weiss (1986) et, Hammes *et al.*, (1992).

5- Evaluation de l'activité enzymatique.

5- 1 Préparation du matériel végétal

Les tubercules fraîchement prélevés dans les champs d'expérimentation ont été lavés et seuls les tubercules non atteints par les maladies ou non blessés ont été sélectionnés. Les tubercules sélectionnés ont été délicatement pelés à l'aide d'un « cutter », de manière à ne pas blesser la pulpe du tubercule. La pulpe ainsi préparée a été à nouveau lavée puis découpée en cossettes d'environ 10 cm d'épaisseur. Elles ont alors été stérilisées pendant 15 minutes avec du chlorure de mercure à 1% dans l'éthanol à 70 % (Okafor *et al.*, 1984) puis, rincées dans de l'eau distillée stérile. Les cossettes ont été ensuite broyées à l'aide d'un broyeur de labo (Robocoupe II) jusqu'à obtention d'une pâte.

5- 2 Préparation des inoculums

Des précultures de microorganismes isolées et purifiées ont été réalisées sur milieu à base d'amidon de manioc de composition suivante :

Farine de manioc tamisé.....	20g
K ₂ HPO ₄	8,7g
MgSO ₄	0,1g
NH ₄ NO ₃	0,05g
H ₂ O distillée	qsp
	1000ml

NB : La farine de manioc tamisée a été préparée à partir des tubercules frais découpés en cossettes séchés à l'étuve à 105°C pendant 24 heures, puis broyés et tamisés à l'aide d'un tamis de mailles de 0,1mm.

Le milieu a été préparé séparément : la farine a été diluée dans 500ml d'eau et stérilisé par filtration (car une stérilisation à la chaleur induirait une cuisson de l'amidon qui aurait pour effet de modifier le milieu de pré culture que nous voulons assez proche du milieu naturel qu'est l'amidon cru de manioc).

Les autres ingrédients ont été dilués dans 500ml d'eau puis stérilisée à 121°C pendant 15 minutes, refroidis et mélangés à la farine de manioc dissoute, précédemment stérilisée.

A environ 100ml de ce milieu, deux anses de microorganismes purifiés ont été inoculés, soit environ 10³ ufc/ml (Brisou *et al.*, 1971). L'ensemble a été incubé à 30°C pendant 18 à 24 heures pour les *Lactobacillus*, et à 25°C pendant 48 à 72 heures pour les levures et moisissures.

5- 3 Ensemencement et conduite de la fermentation

Les pré-cultures précédemment réalisées 10^6 ufc/g de bactéries lactiques, 10^9 cellules/g pour les levures et 10^3 spores/g pour les moisissures ont été malaxé individuellement avec la pâte de manioc stérile. Ces taux ont été choisis afin de se rapprocher le plus d'une fermentation naturelle car similaires aux proportions de différents types de microorganismes détectés au cours d'une fermentation naturelle par Oyéwolé et Odunfa 1988). L'ensemble constitué par le ferment et la pâte à rour sont introduits dans des erlens de 250 ml.

Les échantillons inoculés par les bactéries lactiques ont été incubés à 32°C. Les échantillons inoculés par les levures et moisissures ont été incubées à 30°C.

Le pH a été réglé à 6,9 pour les bactéries lactiques et à 5 pour les levures, par addition de NaOH 0,1N ou de HCl 0,1 N selon que le pH initial a été acide ou basique.

Toutes les fermentations ont été conduites pendant 96 heures et des prélèvements ont été effectués toutes les 12 heures pour les analyses biochimiques et enzymatiques.

6- Extraction et dosage des enzymes

6- 1 Préparation du matériel d'analyse et extraction partielle des enzymes

100 g de pâte en fermentation ont été remis en suspension dans 100 ml d'eau distillée stérile à 30°C puis, centrifugé à 2500rpm pendant 10 minutes. (Ampe et Brauman, 1995).

L'extraction partielle des enzymes a été réalisée, selon le protocole décrit par Ampe et Brauman (1995), par une centrifugation à 2000rpm pendant 30mn. A 100ml de surnageant de centrifugation, 80ml de tampon citrate ont été ajoutés et l'ensemble conservé à 4°C pour la suite des extractions.

6 -2- La linamarase (EC : 3.2.1.21)

L'activité de la linamarase a été évaluée par la méthode décrite par Giraud *et al.*, (1992). Cette méthode comporte les étapes suivantes :

- Extraction

100ml de surnageant de centrifugation précédemment conservée ont été mélangés à 300 ml de solution tampon acétate à 0,1 M. Le mélange a été ajusté à pH 5,5 puis filtré à travers un filtre de Kieselguhr. Le filtrat d'aspect limpide a été conservé à 4°C pendant 16 heures puis, dilué dans deux volumes d'acétone à 0°C. Le mélange a été constamment agité pendant 2 heures dans un bain marie agité puis centrifugé à 2000rpm pendant 5mn. Le précipité vert pâle qui apparaît a été repris dans 10 ml de tampon acétate 0,1 M puis conservé à 4°C. Le surnageant a été recueilli et à nouveau dilué dans 2,3 volumes d'acétone à 0°C et le précipité de linamarase résiduel formé a été récupéré par centrifugation à 2000rpm pendant

5 minutes, puis additionné au précipité précédent et l'ensemble conservé à 2°C pour dosage.

- Dosage

L'activité de la linamarase précédemment extraite, a été déterminée par la capacité de l'extrait à dégrader le substrat chromogène PNPG (P-nitrophenol-β-D glucopyranoside) et en mesurant l'apparition du CN⁻. 400 µl d'extrait, ont été mélangés à 100µl de linamarine à 50mM dilué dans du tampon citrate 0,1 M (pH 6). A intervalles de temps réguliers (1 minute), 50µl de NaOH 0,1M ont été ajoutés pour stopper la réaction, et l'ensemble conservé à 4°C. Le cyanure a été libéré par addition de 50µl de H₂SO₄ 2N et 850µl d'eau distillée à chacune des aliquotes. L'absorbance a été mesurée à 400 nm au spectrophotomètre (Beckman modèle 25). Une unité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme (extrait) libérant 1µmol de CN⁻ par minute à 35°C.

6 -3- Les pectinases

- Extraction : Elle est réalisée selon la méthode de Ampe *et al.*, 1995.

80ml de solution tampon citrate 0,1M pH 6.5 ont été ajoutés à 100ml de surnageant pré extrait, puis centrifugée à 2000 tours pendant 30 mn. Le surnageant a été recueilli, l'activité enzymatique dosée.

- Dosage (Brauman *et al.*, 1995)

La pectine hydrolase (EC 3.1.1.11).

L'activité pectine hydrolase, EC 3.1.1.11), a été mesurée par titration de 1ml d'extrait dans la pectine à 1% à 30°C par du NaCl 0,1M la réaction a été stoppée par du NaOH 0,01M . Une unité enzymatique a été définie comme la neutralisation de 1 μmol de COO^- /minute à 30°C.

La polygalacturonase (EC 3.2.1.15)

L'activité polygalacturonase est mesurée par la méthode de Star *et al.*, (1977). La polygalacturonase (EC 3.2.1.15), est évaluée par viscosimétrie. A 40 ml de pectine à 1% dans 100mM de tampon acétate (pH 4,7), 0,5 ml d'extrait est additionné. La réduction de la viscosité est alors mesurée à 25°C à l'aide d'un viscosimètre de marque PNR 100. L'unité enzymatique correspond à la libération d'1 μmol d'hexose/minute.

6 -4- l' α -amylase (EC 3.2.1.1).

L'activité amylasique a été évaluée par la méthode de Ampe *et al.*, 1995. Cette activité a été dosée par ajout de 0,1 ml d'extrait à 0,8 ml d'une solution contenant 1% d'amidon soluble (sigma) dans un tampon citrate phosphate 0,1 M pH 6,9. La réaction a été stoppée par addition de 0,1 ml d'acide sulfurique à 2N. L'amidon résiduel a été dosé à différents temps d'incubations à 30°C par ajout de 0,1 ml de l'échantillon convenablement dilué à 2,4 ml de réactif iodo-ioduré (Oteng-Gyang, 1979). La densité optique du complexe brun formé a été lue à 620 nm. Une gamme étalon d'amidon soluble allant de 0 à 10 g/l, a été réalisée en

parallèle pour chaque série de mesures. Une unité enzymatique (UE) a été définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire à l'hydrolyse de 10 mg d'amidon en 30 minutes à 30°C.

7 - Dosage des sucres résiduels

7 -1- La linamarine. La teneur en linamarine résiduelle a été évaluée par la méthode de Sylvestre et Arreaudeau, (1983)

100ml de surnageant de centrifugation ont été placés dans un erlen de 250 ml, puis ajusté à 150 ml par de l'eau distillée stérile. L'ensemble a été laissé à température ambiante pendant 4 heures au terme desquelles une filtration a été réalisée à l'aide du papier *watman* n° 5. Le filtrat (environ 150 à 160 ml) a été recueilli dans une solution de soude à 2,5%. A 25 ml de distillat, 2 ml de solution de NH_4OH 6N et 2 ml de solution d'iodure de potassium 5% ont été ajoutés, puis l'ensemble titré à l'aide du Nitrate d'Argent (AgNO_3) 0,02N jusqu'à virage. Le calcul de la teneur en linamarine résiduelle a été réalisé par la formule suivante :

$$Q = V(\text{en ml AgNO}_3) \times 1,08. \text{ Avec :}$$

Q =quantité de linamarine ; V = chute de burette.

7 -2- L'amidon :

L'amidon résiduel a été dosé par la méthode de Oteng-Gyang, (1979) sur 0,1 ml de surnageant de centrifugation dont le pH a été ramené à pH 6,9 par un tampon citrate phosphate 0,1 M. Après quelques minutes d'incubation à 30°C, 0,1

ml de l'échantillon convenablement dilué à 2,4 ml de réactif iodo-ioduré a été lu au spectrophotomètre à une densité optique de 620 nm. Une gamme étalon d'amidon soluble allant de 0 à 10 g/l a été réalisée en parallèle pour chaque série de mesures.

8- Suivi de la croissance microbienne

8 -1 Dénombrement direct sur cellules

Un millilitre du broyat avant centrifugation a été prélevé et des dilutions appropriées ont été effectuées dans une solution de bleu de méthylène à 10 %. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange a été introduit sous lamelle, sur une cellule de Malassez, un dénombrement par comptage direct des levures a été réalisé au microscope à faible grossissement (X 40). Les résultats ont été exprimés en cellules par millilitre (Cell/ml).

8 -2 Dénombrement sur milieu sélectif solide

0,1 ml du concentré a été ensemencé dans la masse sur gélose MRS pour les bactéries et incubé à 37°C, pendant 48 heures alors que les moisissures ont été ensemencées sur milieux PDA en surface et incubés à 30° pendant le même temps. Le dénombrement a été alors réalisé par pointage à l'aide d'un "coulters" électronique, les résultats obtenus, ont été multipliés par les facteurs de dilutions correspondants et exprimés en unités formants colonies par millilitre (ufc/ml).

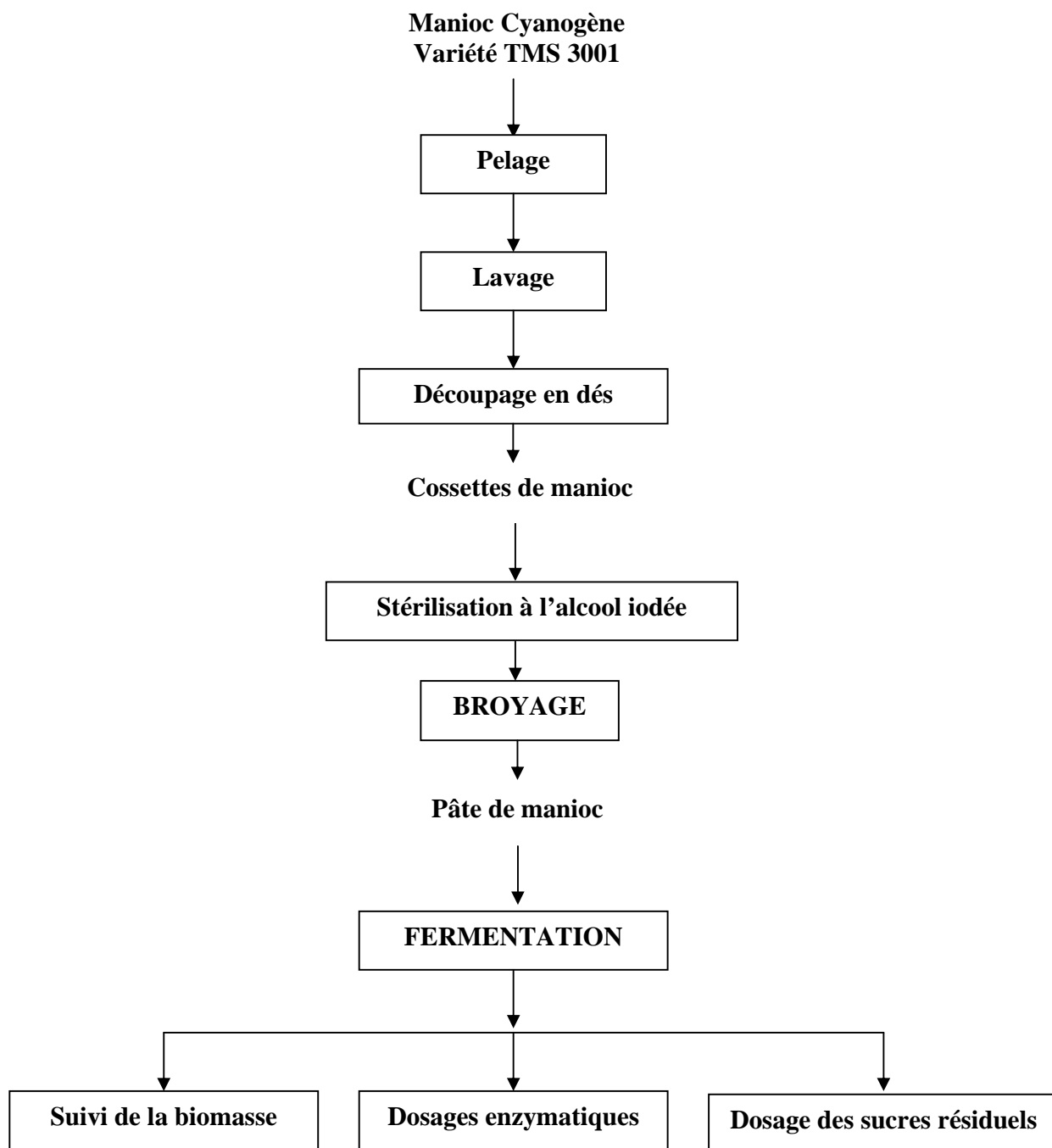


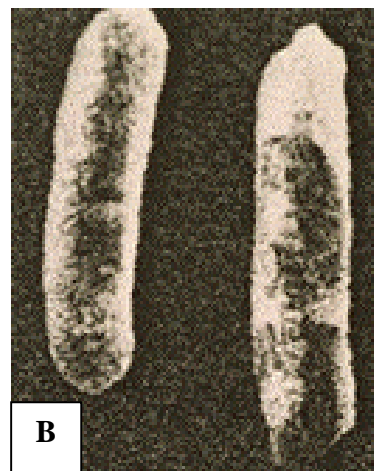
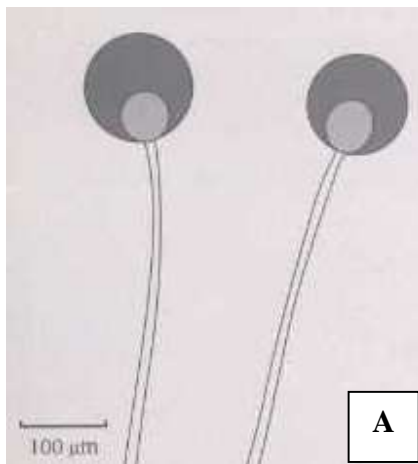
Fig.1: Schéma du procédé d'évaluation de la production des enzymes

III- Résultats

1- Les bactéries lactiques des cossettes de manioc.

Une centaine de souches de bactéries lactiques ont été isolées des cossettes de manioc parmi lesquelles on avait 13 espèces différentes. La majorité de bactéries lactiques ont été isolées sur les échantillons provenant de Ngaoundéré (30 %) et Batouri (23%), Meiganga (20%), Obala (5%), Nkongsamba (15%) et Tibati (7%). Les échantillons provenant de Bamenda ne contenaient pas de bactéries lactiques. De ces 13 espèces, on a environ 60% de *Thermobacterium*, 30% de *Streptobacterium* et 10% de *Bétabacterium*, suivant la classification de Dolczil et Kirsop (1977), Larpent et Larpent-Gouraud, (1985) sur la base de leurs températures et leurs profils fermentaires (Galerie API 50 CH). Les caractéristiques primaires de quelques-unes selon les groupes sont présentées dans les Tableaux 1, 2 et 3. L'identification des souches selon les codifications du "Bergey's manual", du manuel d'identification API 50CH N° 5030 (Strip, Biomerieux Charbonnière, Bains France), et suivant la classification taxonomique de Kandler et Wiess (1986), et Hammes *et al.* (1992), nous ont permis d'identifier des souches suite : *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus casei subsp. pseudo tropicalis*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus coprophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii*.

60% des souches de *Lactobacillus* isolées des cossettes ont une activité amylolytique (photo 4) alors que 46,66% ont une activité β -glucosidase (Photo 3) et environ 53,33% ont une activité pectinolytique.



Dessin *Rhizopus oryzae* (X100) (A) et photographie au microscope électronique à balayage de *Lactobacillus plantarum* (X10000) (B)

Dessin de Heinz JM et Photographie de Djoulde PUK University S.A 2003

Tableau 1: Caractéristiques de quelques Streptobacteriums isolés des cossettes de manioc.

	Acide Lactique	Esculine	Amygdaline	Arabinose	Cellobiose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Melezitol	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Xylose
<i>L. casei casei</i>	L+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>L. plantarum</i>	DL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>L. sake</i>	DL	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>L. alimentarius</i>	L+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-

Tableau 2: Caractéristiques de quelques-uns des Thermobacteriums isolés des cossettes de manioc.

	Acide Lactique	Esculine	Amygdaline	Cellobiose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Mélibiose	Salicine	Sorbitol	Saccharose	Tréhalose
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	D.L	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	D-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbruekii</i>	D-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Lactobacillus gasseri</i>	DL	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+

Tableau 3: Caractéristiques de quelques-uns des Bétabacterium isolées des cossettes de manioc.

	Croissance à 15°C	Croissance à 25°C	Croissance à 14°C	Arabinose	Amygdaline	Cellobiose	Mannitol	Mélézitose	Melibiose	Raffinose	Xylose.	Glucose
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	±	±	+	+	+	+	+	-	+	+	±	+
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	±	-	±	+	-	±	-	±	±	±	+
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	±	+	+	-	+	-	-	+	+	±	+
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+

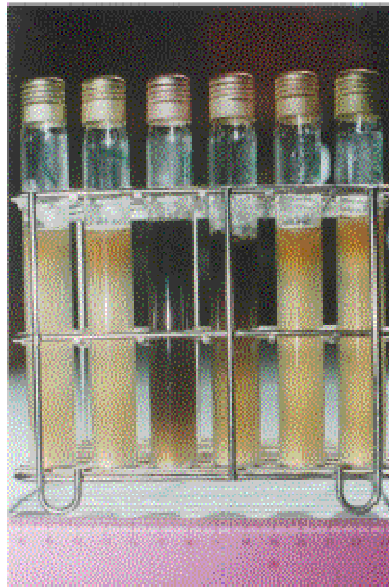


Photo 3 : Test qualitatif d'activité β -glucosidase de gauche à droite : *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oryzae* (Photo Willie et Djoulde ENSAI 1999)

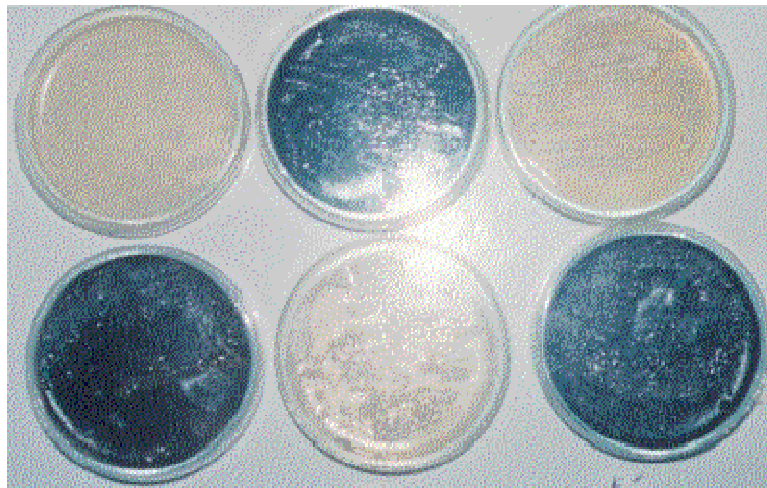


Photo 4 : Test qualitatif d'activité α -amylase. En haut de gauche à droite : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*. En bas de gauche à droite : *Aspergillus flavus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus fumigatus*. (Photo Willie et Djoulde ENSAI 1999)

Tableau 5 : Production qualitative des enzymes par les lactobacilles isolés

Microorganismes	Enzymes				
	α - amylases	β - glucosidase	Pectine hydrolase	Polygalact uronase	Pectine lyase
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	+	+	++	±	+
<i>Lactobacillus casei</i>					
<i>subsp. pseudo tropicalis</i>	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i>	±	+	-	-	±
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	-	-	-	-	±
<i>Lactobacillus coprophilus</i>	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	++	±	-	+
<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	+	-	+	++
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	+	+	+	±	+
<i>Lactobacillus .gasseri</i>	-	-	+	-	-
<i>Lactobacillus delbruekii</i>	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	-	±	+	+
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	-	-	+	-	±

++ : forte activité (diamètre auréole supérieure à 10mm)

+: Activité moyenne (diamètre auréole comprise entre 5-10 mm)

± : Activité intermédiaire (diamètre auréole comprise entre 1-5 mm)

- : Activité nulle (pas d'auréole)

2- Les levures et moisissures des cossettes de manioc

Parmi tous les micro-organismes isolés, de nos échantillons, une vingtaine appartiennent au groupe des levures et moisissures. Parmi eux, 10 % proviennent des échantillons de Ngaoundéré, 27% des échantillons de Bamenda, 12% des échantillons de Batouri, 5% des échantillons de Meiganga, 15% des échantillons d'Obala, 17% des échantillons de Nkongsamba, 14% des échantillons de Tibati.

Les identifications menées, nous ont permis de noter que les levures de genres *Saccharomyces* et *Candida* ont été prédominantes parmi les levures et moisissures. On notera ainsi la présence des espèces comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida krusei*, *Geotrichum candidum* (Tableau 6). 67% des levures ont une activité α -amylasique, 17% une activité β -glucosidase, et 53% une activité pectinolytique. Parmi les moisissures, les espèces *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavipes* et *Aspergillus sparsus*, ont été isolés et identifiées. 35% ont une activité α -amylasique, 25% une activité β -glucosidase et 75% une activité pectinolytique (Tableau 6).

Tableau 6 : Production qualitative des enzymes par les levures et moisissures isolées des cossettes de manioc

Microorganismes	Enzymes				
	α - amylases	β - glucosidase	Pectine hydrolase	Polygala cturonas e	Pectine lyase
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	+	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	++	±	+	+	+
<i>Candida pseudotropicalis</i>	±	-	-	+	-
<i>Candida krusei</i>	+	-	-	+	±
<i>Geotrichum candidum</i>	+	-	-	-	+
<i>Rhizopus nigricans</i>	+	-	-	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	++	++	++	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	+	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	-	+	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	+	-	+
<i>Aspergillus flavipes</i>	-	-	-	+	±
<i>Aspergillus sparsu</i>	-	-	±	±	-

++ : forte activité (diamètre auréole supérieure à 10mm)

+ : Activité moyenne (diamètre auréole comprise entre 5-10 mm)

± : Activité intermédiaire (diamètre auréole comprise entre 1-5 mm)

- : Activité nulle (pas d'auréole)

3–Activité enzymatique des souches sélectionnées

- *Les amylases :*

Les cinétiques d'activité amylolytique sont globalement similaires aux cinétiques classiques de production de métabolite avec une phase de latence, une phase d'accélération, dont la durée varie selon les germes, une phase exponentielle avec accélération constante, et des légères phases stationnaires (Fig.2.A,B,C).

Les bactéries lactiques présentent globalement des activités variant de $5000 \pm 100 \text{ UE/l}$ observés chez *Lactobacillus fermentum* à $18000 \pm 500 \text{ UE/l}$ observés chez *Lactobacillus plantarum*. On notera que pour la souche de *Lactobacillus plantarum*, meilleure souche à activité amylolytique la phase de latence dure 36 heures à 48 heures (Fig. 2 A). Cette durée de la phase d'adaptation est précurseur d'une phase d'accélération et d'une phase exponentielle dynamiques, en effet dans le cas de *Lactobacillus plantarum* la phase exponentielle va de 24 heures à 60 heures, temps au bout duquel, l'activité amylasique se stabilise autour de $16000 \pm 300 \text{ UE/l}$ à $17000 \pm 500 \text{ UE/l}$. Chez toutes les deux autres bactéries la phase exponentielle ne dure que quelques heures avec des optimums d'activités à $1500 \pm 300 \text{ UE/l}$.

L'espèce *Rhizopus oryzae* donne les meilleurs résultats avec une activité de plus de $10000 \pm 1000 \text{ UE/l}$ après 12 heures seulement alors que toutes les autres souches de champignons n'atteignent pas ce résultat même après 96 heures de fermentation, temps au bout duquel on a chez la même souche, près de

20000±500UE/l. On observe néanmoins, que les bactéries lactiques ont des taux variants de 5000UE/l à 18000UE/l. On note globalement une similitude entre l'augmentation de l'activité enzymatique et la dégradation de l'amidon (Tableau 8) ce qui laisse suggérer un effet de l' α -amylase produite par les microorganismes sur la dégradation de l'amidon de manioc. Les corrélations entre la dégradation de l'amidon et l'augmentation de l'activité enzymatique observée (Tableau 8) indiquent que la dégradation de l'amidon est liée à l'augmentation de l'activité de l' α -amylase produite par les microorganismes. Ces observations ont été confortées par le fait que les meilleurs taux de dégradation ont été obtenus avec la souche de *Rhizopus oryzae*, avec une digestion presque complète après 36 heures de fermentation avec un taux résiduel d'amidon de l'ordre de 0,5±0,08mg/g (Fig. 2 B et D).

La dégradation de l'amidon de manioc par les microorganismes indique globalement une dégradation plus rapide chez *Lactobacillus plantarum*, *Rhizopus oryzae*, que chez les autres microorganismes (Tableau 7). On notera particulièrement l'activité de l'espèce *Rhizopus oryzae* qui en 12 heures de temps métabolise environ 70% d'amidon et en 24 heures près de 85% (Fig. 2 D), alors que les espèces telle que *Candida tropicalis* n'accèdent aux mêmes résultats qu'en un temps un peu plus long (72 heures). Les autres microorganismes ont des activités globalement plus lentes et moins denses mais avec des taux de dégradations non négligeables (Fig. 2 C). La souche de *Lactobacillus plantarum* dégrade jusqu'à 75% d'amidon en 72 heures de fermentation alors que les autres

bactéries atteignent difficilement ce taux. Les cinétiques d'activité α -amylase, et de dégradation de l'amidon de manioc varient cependant selon les souches (Tableau 7), on ne note pas des cinétiques types (Fig. 2, Tableau 7).

Les observations au microscope électronique à balayage des granules d'amidon au cours de la fermentation par la souche de *Lactobacillus plantarum* indique une digestion presque totale des granules après 72 heures de fermentation on notera aussi que cette digestion est dépendante de la croissance microbienne au cours du rouissage (Photo 5) ce qui indique que l'activité α -amylase et la dégradation de l'amidon sont liées a la croissance microbienne.

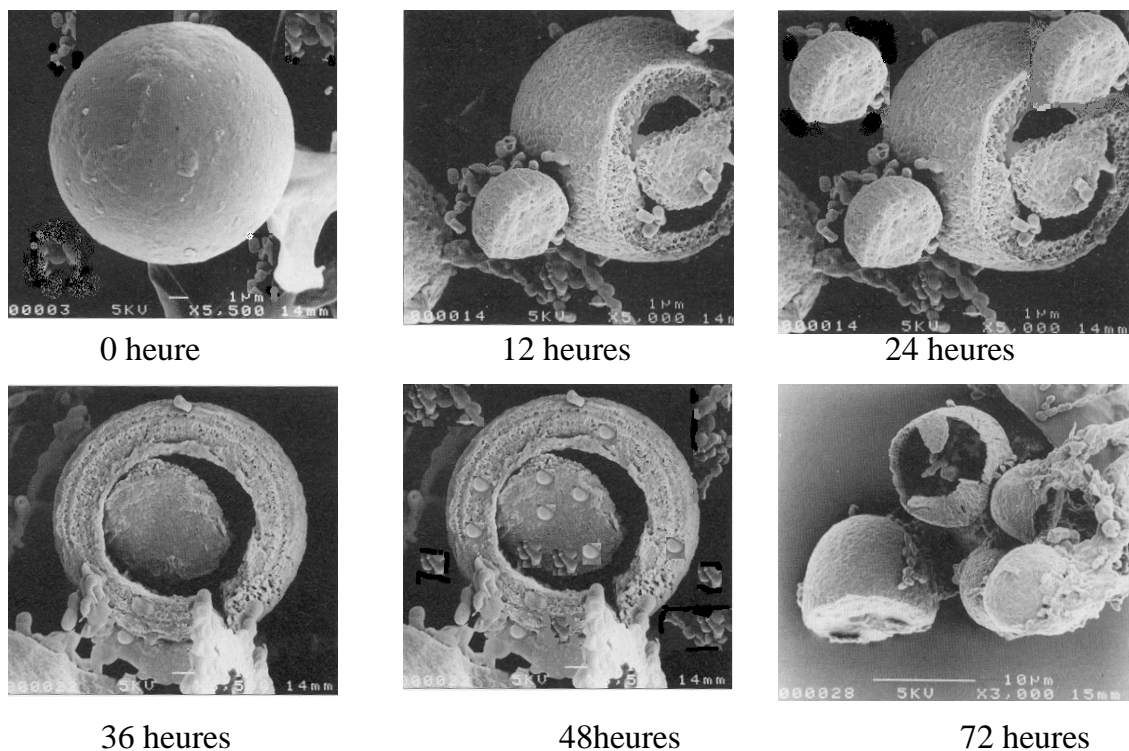


Photo 5 : Dégradation d'une granule d'amidon par la souche de *Lactobacillus plantarum*

Tableau 7 : Equations de Cinétiques de disparition des substrats (Amidon et linamarine) selon les microorganismes.

	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Cinétique de disparition d'amidon	$y = -0,001X + 0,0098$ $R^2 = 0,8893$	$y = -0,0008X + 0,018$ $R^2 = 0,9806$	$y = -0,0006X + 0,009$ $R^2 = 0,9692$	$y = -0,0008X + 0,006$ $R^2 = 0,5279$	$y = -0,0007X + 0,01$ $R^2 = 0,9763$	$y = -9 \cdot 10^5 X + 0,009$ $R^2 = 0,7982$
Cinétique de disparition de linamarase	$y = -14,3X + 103,8$ $R^2 = 0,7827$	$y = -8,78X + 127,88$ $R^2 = 0,812$	$y = -8,63X + 112,3$ $R^2 = 0,7259$	$y = -7,60X + 117,93$ $R^2 = 0,9846$	Pas d'activité	Pas d'activité

NB : Les équations des cinétiques ont été déterminées à l'aide du logiciel DACSL (Agin et Blau, 1982).

Tableau 8 : Corrélations entre l'activité des enzymes et les substrats dégradés (P<0,05)

	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>
α -amylase et amidon	$r = 0,97$ $P < 0,05$	$r = 0,92$ $P < 0,05$	$r = 0,97$ $P < 0,05$	$r = 0,93$ $P < 0,05$	$r = 0,90$ $P < 0,05$	$r = 0,85$ $P < 0,05$
β -glucosidase et Linamarine	$r = 0,90$ $P < 0,05$	$r = 0,80$ $P < 0,05$	$r = 0,38$ $P < 0,05$	$r = 0,82$ $P < 0,05$	Pas d'activité	Pas d'activité

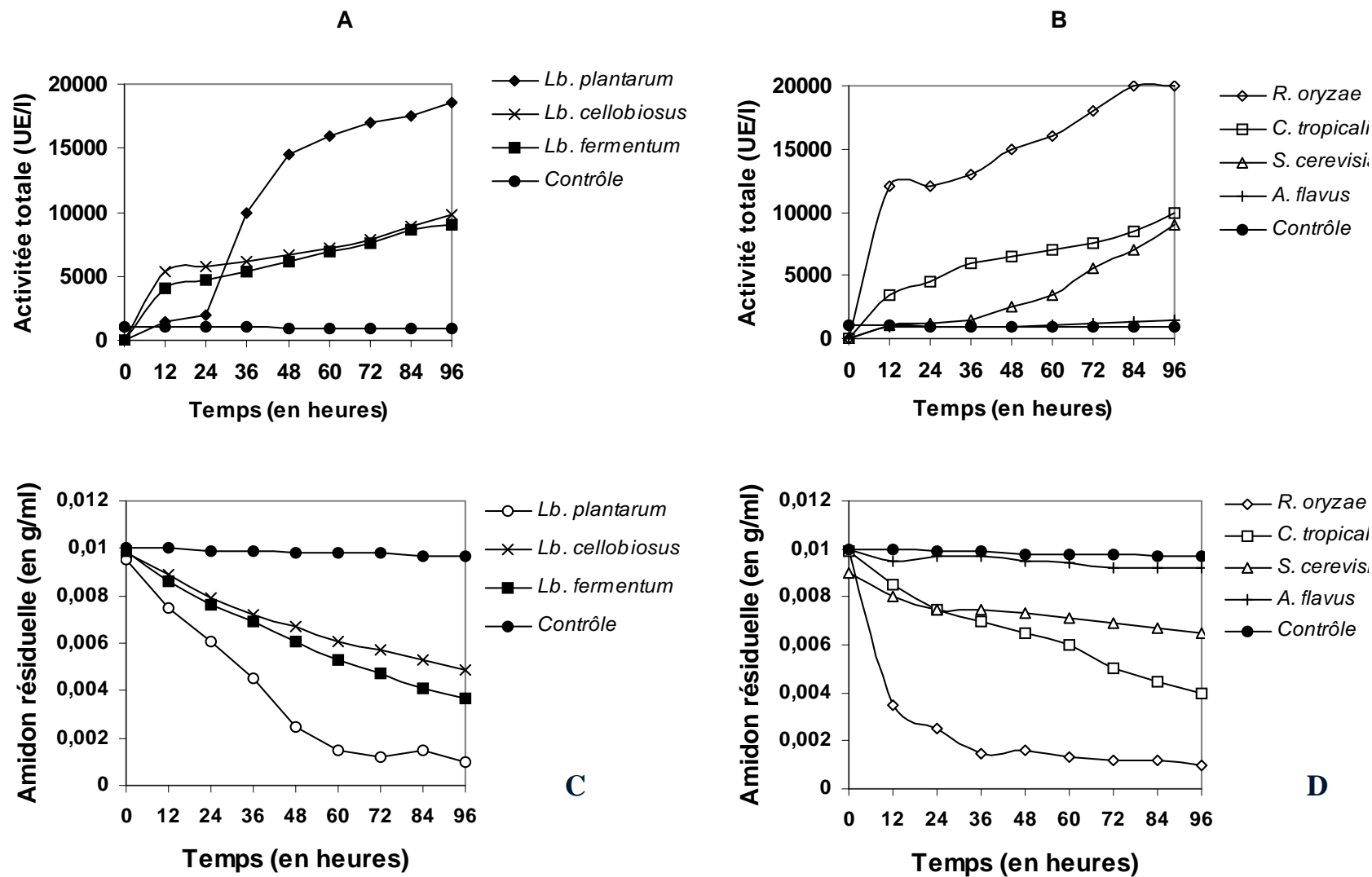


Fig. 2 : Activité amylolytique (A et B) et dégradation de l'amidon de manioc (C et D) au cours du temps par les souches sélectionnées

- ***La β -glucosidase :***

L'activité β -glucosidase des microorganismes, globalement ne suit pas comme pour l' α -amylase une cinétique classique de production de métabolite, ici on n'observe pas de phase d'adaptation quelque soit le germe incriminé (Fig. 3 A et B).

La souche de *Lactobacillus plantarum* présente une activité β -glucosidase meilleure, parmi tous les microorganismes isolés (levures et moisissures compris) avec une activité de $1200 \pm 100 \mu\text{mol de CN}^-/\text{minutes}$, en 12 heures de fermentation soit un total de $864000 \pm 200 \mu\text{mol de CN}^-$ libérés. A partir 48 heures de fermentation, la même souche présente une vitesse de libération des ions CN^- de l'ordre de $2000 \pm 300 \mu\text{mol de CN}^-/\text{minute}$ (Fig. 3 A et B). La souche de *Lactobacillus cellobiosus* dont les vitesses de libération de CN^- des tubercules de manioc vont de $1000 \pm 100 \mu\text{mol de CN}^-/\text{minutes}$ à $1400 \pm 100 \mu\text{mol de CN}^-/\text{minutes}$, semble aussi être intéressante du point de vue de la production de la β -glucosidase.

L'activité β -glucosidase a été globalement moins importante chez les levures et moisissures que chez les lactobacilles (Fig. 3 A et B).

On note une similitude entre l'activité de la β -glucosidase et la disparition de la linamarine (Tableau 8) avec globalement une activité plus accentuée chez les *Lactobacillus* avec des taux allant de 40 à 80% de réduction après 96 heures de fermentation alors que chez les champignons on a moins de 20% de réduction même après 96 heures de fermentation.

On note une activité plus accentuée chez *Lactobacillus plantarum* qui en 24 heures réduit la linamarine de près de 50% avec des vitesses plus importantes que celles observées chez *Lactobacillus cellobiosus* et *Lactobacillus fermentum* (Tableau 7, Fig. 3 C)

Les levures et moisissures ont été globalement peu actives pour la dégradation de glucosides (Fig. 3 D). On notera quand même une dégradation non négligeable par *Rhizopus oryzae* avec un taux de réduction de près de 50% après 96 heures de fermentation.

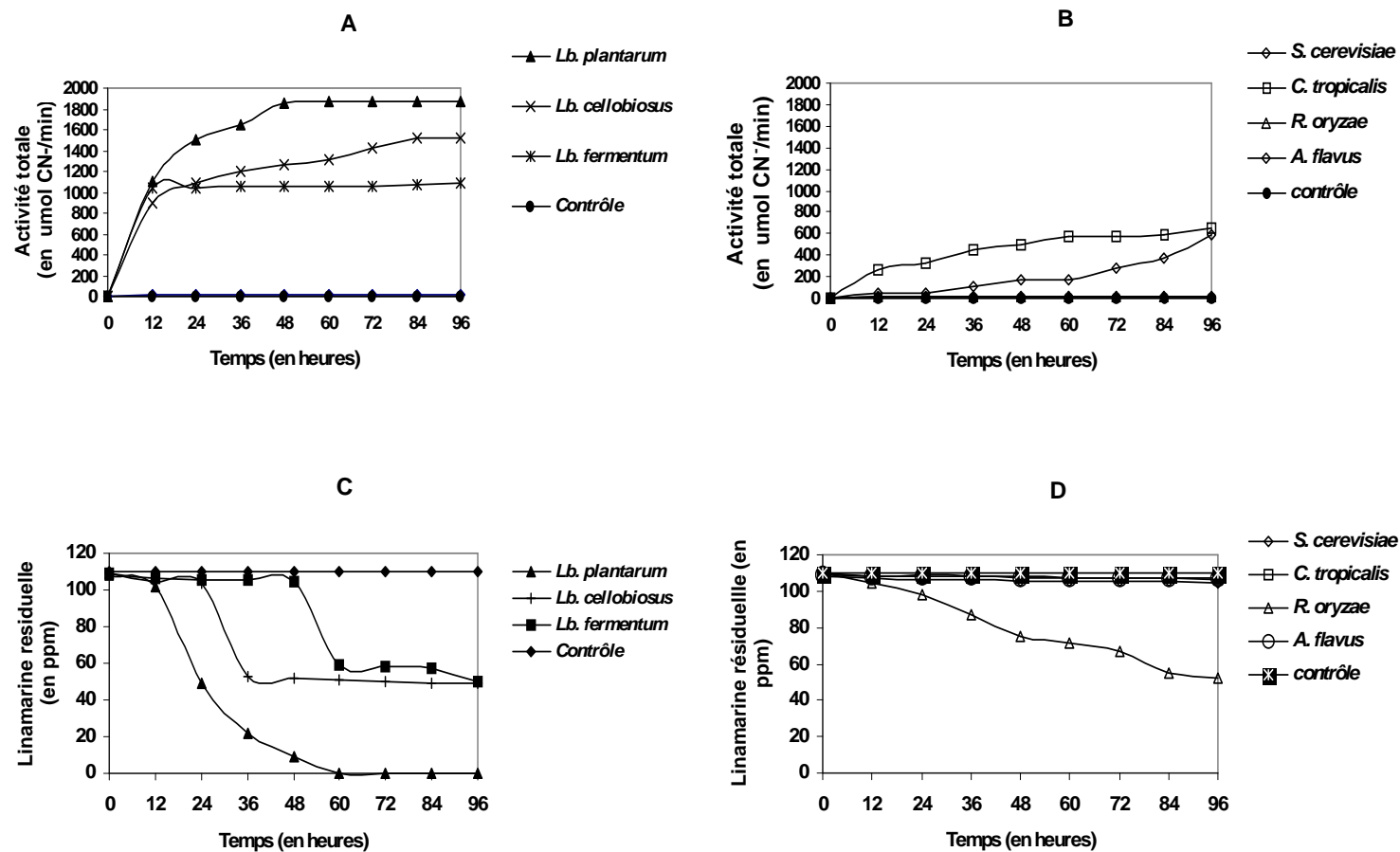


Fig. 3 : Activité β -glucosidase et dégradation de la linamarine purifiée par les souches sélectionnées au cours du temps

- Les pectinases:

L'activité pectinolytique (pectine hydrolase et polygalacturonase) indique globalement une activité similaire aussi bien chez les bactéries lactiques que chez les levures et moisissures (Fig. 4). On note une activité un peu plus accentuée chez *Lactobacillus cellobiosus* et *Rhizopus oryzae* avec respectivement 2,1 et 2,3 $\mu\text{mol COO}^-/\text{mn}/\text{mg}$, après 96 heures de fermentation, alors que le manioc en cours de fermentation naturelle développerait une activité de 1,1 $\mu\text{mol COO}^-/\text{mn}/\text{mg}$ pendant le même temps de fermentation.

L'analyse des variances révèle une différence significative ($P < 0,05$) au niveau de l'activité pectinolytique. La souche de *Lactobacillus plantarum* ne produit pas de pectinase alors que les autres souches présentent des activités similaires à une fermentation naturelle ($P < 0,05$).

On doit aussi noter la cinétique particulière chez *Aspergillus flavus* qui après une légère phase exponentielle de 24 heures avec une valeur de 0,5 $\mu\text{mol COO}^-/\text{mn}/\text{mg}$ qui s'annule vers la 72^{ème} heure.

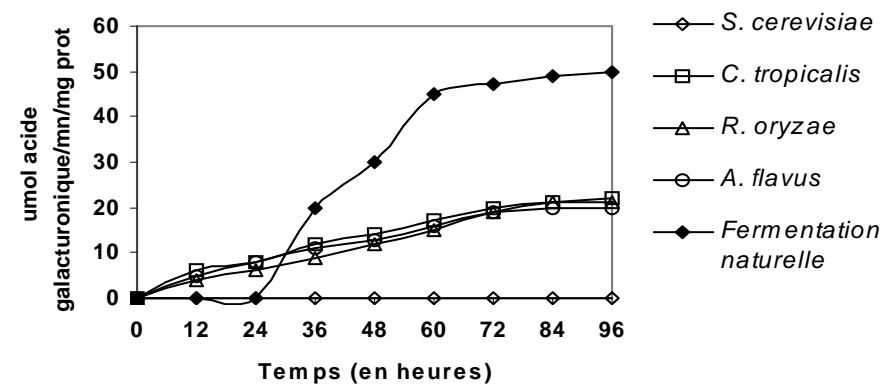
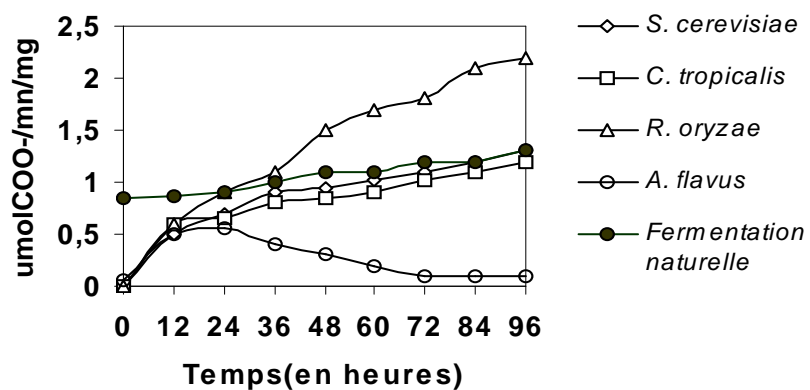
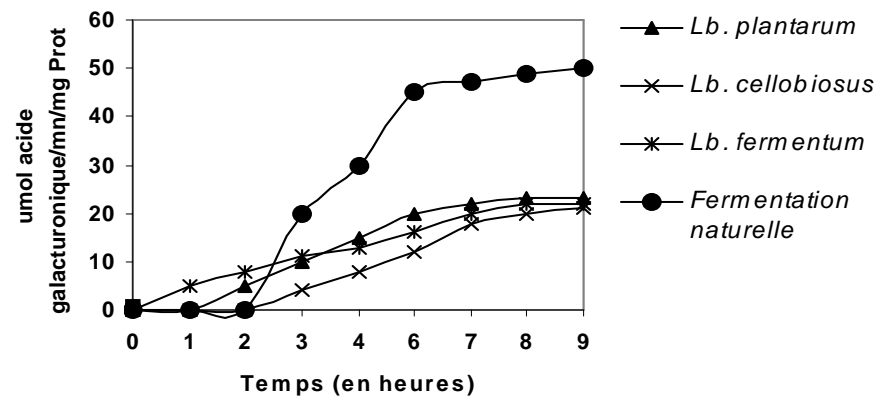
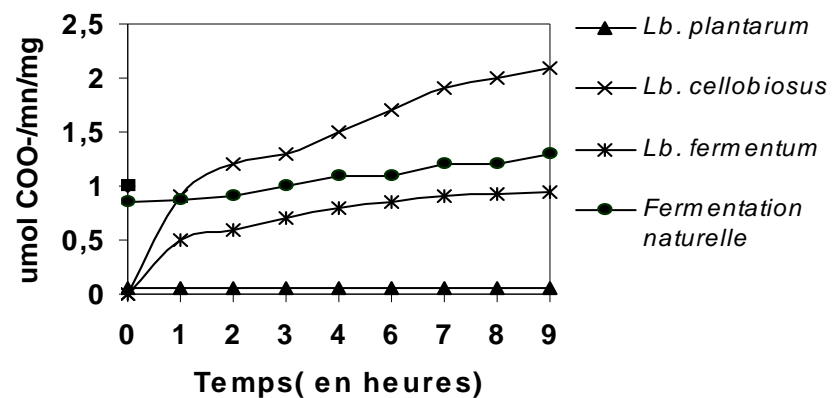


Fig. 4 : Production de la pectine hydrolase (A) et de la polygalacturonase (B) par les souches sélectionnées au cours du temps

VI - Discussion

La distribution de microorganismes selon la provenance indique clairement la prédominance des lactobacilles dans les échantillons provenant des localités de Ngaoundéré, Meiganga surtout alors que les échantillons provenant de Bamenda et de Nkongsamba. Si nous nous référons aux travaux d'Oyéwolé et Odunfa (1988), les populations des localités de Ngaoundéré seraient les plus grands pratiquants du « short cuts ». En effet ces auteurs ont suivis la succession des microorganismes au cours d'un rouissage naturel, et ils ont indiqués que les microorganismes prédominant en début de fermentation étaient des lactobacilles qui dès la 48^{ème} heure disparaissaient progressivement pour laisser la place aux levures et moisissures qui assurent la fin de la fermentation (Oyéwolé et Odunfa, 1988). La prédominance de lactobacilles dans les échantillons de Ngaoundéré et Meiganga indique que le processus fermentaire a été écourté. Les échantillons provenant de Tibati, Obala, et Batouri par contre contiennent presque à part égales les deux groupes de microorganismes, ceci indique que la fermentation à ce niveau a été arrêtée vers le troisième jour, temps au bout duquel selon Okafor, (1978) et Oyéwolé, (1995) les deux types de microorganismes seraient en phase intermédiaire. Enfin les échantillons provenant de Bamenda et Nkongsamba contiennent plus de levures et moisissures que les Lactobacilles. Ceci indique que la fermentation de ces échantillons a été conduite de bout en bout.

On notera par ailleurs (Tableau 5) que globalement, les souches isolées sont plus ou moins amylolytiques avec respectivement 60% des souches de *Lactobacillus* 66,66% des levures et 35% de moisissures. La forte proportion des microorganismes producteurs d' α -amylases (60%) est révélatrice. En effet Oyéwolé et Odunfa (1989)

indiquent une forte corrélation entre les substrats amidonnés naturels et la présence des microorganismes amylolytiques lors des fermentations de ces substrats. La présence de microorganismes amylolytiques en forte proportion pourrait être liée au fait que le manioc soit à près de 90% constitué d'amidon (Chuzel, 1990).

Concernant le ramollissement, environ 54% des souches de *Lactobacillus*, 53% de levures et 75 % de moisissures ont été identifiés comme productrices de pectine hydrolases et de polygalacturonase donc, susceptibles d'attaquer les structures du squelette de la paroi cellulaire (pectine) des tubercules de manioc et contribuer ainsi à ramollir rapidement les tubercules au cours du rouissage.

La présence des microorganismes à activité pectinasique pourrait indiquer le rôle des microorganismes au cours des processus de ramollissement lors de la fermentation. L'importance des microorganismes et des moisissures en particulier, dans le processus de fermentation a été établie (Yandju, 1989). En effet certaines espèces comme *Mucor muceolo*, *Rhizopus nigricans*, ...etc, ramolliraient les tubercules et pourraient entraîner dans certains cas la séparation de l'amidon des fibres.

La production qualitative de la β -glucosidase indique globalement qu'environ 46,66% des souches de bactéries lactiques 16,66% de levures et 25% de moisissures isolées ont été susceptibles de dégrader la linamarine. Ces germes pourraient jouer également un rôle dans les processus de détoxification du manioc aux cotés de la linamarase endogène. Okafor en 1977, Ejiofor et Okafor (1981), indiquent la présence des *Candidas* dans l'achèvement des processus de dégradation des composées cyanés. Leur prédominance en fin de fermentation pourrait expliquer leur présence sur des

cossettes. Collar et Lévy en 1959 ont noté la prédominance de l'espèce *Géotricum candidum*, en fin de fermentation. Celui-ci intervenant après l'action des *Corynebacterium manihot*, pour achever la dégradation des glucosides notamment favorisés par l'abaissement du pH et qui acidifierait encore plus le milieu et favoriserait la production des cétones, des aldéhydes, et des esters. Oyewole et Odunfa (1992) ont révélé que certaines souches de moisissures entrant dans la fermentation du manioc et plus précisément *Aspergillus sydowi* et *Fusarium esquiseti* produisent la linamarase responsable de l'hydrolyse des glucosides cyanogénétiques.

Outre leur rôle dans la détoxification, les microorganismes isolés pourraient également intervenir dans l'amélioration des qualités organoleptiques, par la production d'acides, cétones, aldéhydes, esters... En effet, les racines tubéreuses de manioc peuvent, moyennant un certain degré d'humidité, subir une fermentation sèche ou fermentation à l'air libre (Ampe *et al.*, 1994). Cette fermentation aboutirait à la réduction du taux de cyanures des cossettes et à l'élaboration des propriétés organoleptiques de la farine et autres pâtes (fufu) produites de cette manière (Giraud *et al.*, 1995).

La présence d'une activité amylasique au cours du rouissage a été déjà mentionnée par Oyéwolé (1992). Cet auteur attribue cette activité aux bactéries amylolytiques aérobies dont la disparition dès les premières heures du procédé expliquerait la baisse brutale de l'activité amylasique au cours du rouissage. Dans notre étude, l'évolution des microorganismes amylolytiques atteint leur optimum à partir de 48 heures pour la plupart des *Lactobacilles* et *Rhizopus oryzae*. Kéléké *et al.*, (1995) ont indiqué que l'activité amylasique endogène du manioc disparaissait après

48 heures. Ce qui voudra dire que la reprise ultérieure de l'activité enzymatique au cours de ces fermentations serait le fait des microorganismes. Kéléké, Koupolo-Kimpolo et Braumam (1995) indiquent à cet effet que la production des α -amylases lors de la fermentation naturelle du manioc est le fait exclusif des microorganismes. Giraud et Brauman (1995) ont à cet effet isolé une souche de *Lactobacillus plantarum* à activité linamarase et α -amylase. Les activités obtenues au cours des essais réalisés par Giraud et Brauman (1995) sont nettement supérieures aux activités obtenues au cours de la présente étude pour les *Lactobacilles*. Ceci est normal compte tenu des conditions opératoires des expérimentations notamment l'utilisation d'un micro fermenteur et un milieu liquide.

Collard et Lévy (1959) incriminent l'intervention d'une bactérie, *Corynebacterium manihot* présente dans la pulpe dans l'hydrolyse de l'amidon grâce à une α -amylase exogène pour produire les acides organiques principalement de l'acide lactique. Okafor (1977) indique que les micro-organismes isolés lors d'une fermentation sur une période de six jours sont principalement les *Leuconostocs* et les genres *Alcaligènes* de même que les *Lactobacillus* rencontrés principalement les deux premiers jours de fermentation. Ces microorganismes interviendraient dans la dégradation des glucosides cyanogénétiques par la production de linamarase exogène. Nous remarquerons que parmi les souches isolées ici, seules les bactéries ont une activité linamarase significative. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature, des études sur la linamarine microbienne bien qu'une linamarase endogène (de la plante elle-même) aie déjà été signalée (Ejiofor et Okafor 1981). Nartey (1981) suggère que la présence de *Pseudomonas sp.* dont l'activité productrice de cyanure à partir de la

glycine a été détectée, peut contribuer à éliminer à des niveaux résiduels, des composés cyanés. Il soulève également la question de savoir si les micro-organismes entrant dans la fermentation qui ont été susceptibles de produire la β -glucosidase ne contribuent avec la linamarase endogène à la détoxification du manioc. Ikediobi *et al.*(1985) suggèrent que des micro-organismes puissent provoquer des dommages structuraux aux cellules des tubercules et ainsi permettre à la linamarase endogène d'entrer en contact avec la linamarine.

Ampe *et al.*, (1995), indiquent que le ramollissement n'est pas seulement le fait d'un stress physique, mais aussi de l'activité des microorganismes. Dans le même sens, ils ont pu isoler et purifier partiellement une pectinemethylesterase endogène dans les tubercules de manioc frais (Ampe *et al.*, 1995). Mais les polygalacturonases, les pectine hydrolases, n'ont pu être détectés qu'au cours des fermentations naturelles des tubercules de manioc, ce qui induirait l'origine bactérienne de ces enzymes. Les résultats que nous avons pu obtenir ici viennent conforter cette position, notamment les fortes activités pectine hydrolase et polygalacturonase obtenus au cours de nos essais. On remarquera à cet effet que la plupart des levures et moisissures utilisées au cours de nos essais produisent la pectine hydrolase au même titre que la majorité des lactobacilles isolés. Ceci est indicatif de la participation des microorganismes aux processus de ramollissement. Les fortes activités obtenues au cours de nos essais soit $1,5 \pm 0,4$ à $2,3 \pm 0,2$ $\mu\text{mol COO}^-/\text{mn}/\text{mg}$ pour la pectine hydrolase, par rapport aux taux trouvés dans la littérature pour l'enzyme endogène ($0,5-0,7$ $\mu\text{mol COO}^-/\text{mn}/\text{mg}$) que pour les enzymes microbiens ($0,6-1,8$ $\mu\text{mol COO}^-/\text{mn}/\text{mg}$) (Ampe *et al.*, 1995) doivent être liées aux conditions de culture notamment l'utilisation des cultures pures.

VII- Conclusion partielle

Nous constatons globalement que la plus part des microorganismes isolés et identifiés ont été productrices d' α -amylases (60%), de linamarase (46%), et de pectinases (36%). Ces enzymes intervenant principalement au cours du rouissage naturel du manioc, sont responsables entre autres :

de la dégradation des glucosides cyanogénétiques (linamarine), et par là contribueraient à la détoxification du manioc au cours du rouissage;

du ramollissement des tubercules au cours du rouissage, par dégradation des pectines qui constituent le squelette du tubercule, ceci aurait comme corollaire une altération des tissus et un meilleur contact entre les microorganismes et les principaux enzymes (responsables de la libération des composés tel les aldéhydes, les corps cétoniques ...) et le substrat (amidon).

Les capacités des différentes souches sélectionnées à produire les principaux enzymes intervenant dans les processus biochimiques ayant lieu lors du rouissage naturel des tubercules de manioc ont été évalués. La mise sur pied d'un ferment devant tenir compte des capacités des germes utilisés à produire ces d'enzymes.

Parmi les microorganismes pré sélectionnés, certains présentent des potentialités enzymatiques intéressantes. On a notamment la souche de *Lactobacillus plantarum* dont l'activité α -amylase ($18000 \pm 500 \text{ UE/ml}$), β -glucosidase ($2000 \mu\text{mol CN}^-/\text{mn}$) peut permettre de réaliser à la fois deux objectifs dont la production des acides organiques, et la dégradation des composés cyanés. Nous noterons aussi que la souche de *Rhizopus oryzae* produit l' α -amylase ($20000 \pm 500 \text{ UE/ml}$) et la pectine

hydrolase ($2,3 \pm 0,2 \mu\text{mol COO}^-/\text{mn}/\text{mg}$). Cette dernière enzyme intervient nous l'avons, vu dans les processus de ramollissements.

Nous avons porté notre choix sur la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum*, car en nous référant aux résultats obtenus ci-dessus, elle a été la meilleure souche productrice de deux enzymes au moins (α -amylases, et β -glucosidase) de plus elle possède aussi une activité pectinase.

La souche de *Rhizopus oryzae*, elle aussi a été choisie car présente le profil enzymatique recherchés (α -amylases, β -glucosidase, et activité pectinase).

Ces deux souches outre les caractéristiques particulièrement intéressantes qu'elles présentent, possèdent la plus part des critères recherchés pour un starter destiné à la bioconversion des tubercules de manioc à savoir :

- une production rapide des enzymes, et une gamme assez variée de ses enzymes ;
- la capacité à métaboliser l'amidon (principale source de carbone disponible) ;
- l'hydrolyse des glucosides cyanogénétiques du manioc afin d'en réduire la toxicité ;
- la production des pectinases et cellulases afin d'accélérer les processus de ramollissement.

Les deux souches sont par conséquent retenues pour la suite du travail et seront utilisées aussi bien en culture pure qu'en culture mixte afin d'évaluer leurs capacités réelles à assurer la bioconversion des tubercules de manioc.

Chapitre 3

EVALUATION DE LA BIOCONVERSION DES TUBERCULES DE MANIOC PAR LES SOUCHES DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ET *RHIZOPUS ORYZAE*

I- Introduction

La partie précédente nous a permis de sélectionner les souches de *Lactobacillus plantarum* et *Rhizopus oryzae* comme devant faire partie de notre ferment à cause de leurs potentialités enzymatiques, qui correspondent à celles recherchées pour la bioconversion de la pulpe du manioc. Les critères nécessaires pour un starter destiné à la bioconversion des racines de manioc étant : posséder une activité amylasique, posséder une activité β -glucosidase, et une activité pectinase (Keleke *et al.*, 1995). Bien que les microorganismes sélectionnés aient montré de bonnes aptitudes pour la bioconversion du manioc, il se pourrait que l'on puisse faire face à quelques problèmes d'ordre pratique. En effet Roblain *et al.*, 1995 indiquent que le contrôle d'une fermentation de type artisanale par des microorganismes qui nécessite le passage d'un substrat sec à un substrat humide pourrait être néfaste pour l'activité des microorganismes. Les germes sélectionnés sur substrat sec (cossettes de manioc), pourraient ne pas avoir de bons rendements de bioconversion sur milieu humide comme c'est le cas au cours d'une fermentation naturelle sauvage. Okafor (1977) indique à cet effet que le manioc frais et le manioc fermenté ne sont pas typiquement identiques, il existe d'ailleurs des différences fondamentales dont la teneur en sucres fermentescibles qui est de l'ordre de 30% à 40 % dans les tubercules fermentés alors

que dans le manioc frais il ne représente que 5% à 6% l'amidon étant le constituant majeur (Chuzel, 1990). Ce changement de substrat pourrait avoir une influence sur la capacité des microorganismes à s'adapter et à accepter le nouveau milieu. D'autre part, le passage d'une fermentation artisanale à une fermentation contrôlée semi-industrielle, par utilisation d'une ou de plusieurs souches exige le respect de la balance des différentes espèces microbiennes présentes au cours d'une fermentation naturelle aussi bien quantitativement que qualitativement (Roblain *et al.*, 1995). Au cours d'une fermentation naturelle, le respect des proportions microbiennes implique des effets synergiques, qui influencent beaucoup les processus biochimiques et physico-chimiques ayant cours (Oyéwolé, 1990). Okafor, Ijioma et Oyolou, (1984) indiquent à cet effet que le respect des proportions est tributaire de la reproductibilité de l'aspect organoleptique du produit fini. Les questions de recherche soulevées sont dès lors les suivantes :

le changement de substrat à opérer peut-il influencer l'aptitude à la biodégradation des souches testées? L'effet de l'utilisation d'une ou deux souches en fermentation contrôlée sera-t-il identique à celui de la multitude de souches d'une fermentation naturelle?

Les objectifs de ce chapitre sont : - d'évaluer directement l'aptitude des microorganismes sélectionnés *Lactobacillus plantarum* et *Rhizopus oryzae*, à améliorer la fermentation du manioc en les inoculant en souche pure sur du manioc cyanogène ;

- d'établir l'importance de l'activité de ces microorganismes aussi bien en cultures pures qu'en culture mixtes, au cours de la fermentation.

II- MATERIELS ET METHODES

II-1 Expérimentations

Trois formulations du ferment (*Lactobacillus plantarum* seul, *Rhizopus oryzae* seul, et une culture mixte des deux microorganismes) ont été testées. Un plan d'expérience a été élaboré à l'aide du logiciel NEMROD (Mathieu et Phan-Tan-Lu, 1980).

L'effet de ces trois formulations du ferment a été étudié sur la dégradation des glucosides cyanogénétiques, la teneur finale en protéines, le pH du milieu de fermentation, et le ramollissement au cours du temps.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels S-Plus 2000, Statgraphics Plus 3.0 pour office 2000.

II-2 PREPARATION DES INOCULUMS.

II-2-1 LACTOBACILLUS PLANTARUM

Des tubes inclinés de cultures pures de *Lactobacillus plantarum* précédemment préparés et conservés au frais, une anse de micro-organismes a étéensemencée dans 500 ml de bouillon MRS stérile puis, l'ensemble incubé à 45 °C. Au bout de 48 heures, un dépôt trouble s'est formé dans la partie inférieure de notre erlen. Ce dépôt trouble a été récupéré par décantation, puis introduit dans des tubes à centrifuger préalablement stérilisés. Nous avons ensuite centrifugé à 5000 tours/mn, pendant 5 minutes. Le culot de centrifugation a été alors recueilli, puis lavé trois fois à l'eau physiologique stérile. Un millilitre de culture pure ainsi obtenu, est prélevé, pour

effectuer un dénombrement, par la méthode classique de dilutions ensemencement sur gélose MRS. Le reste du culot a été utilisé pour réaliser des dilutions appropriées de manière à avoir des concentrations variant de 10^6 ufc/ g de bactéries lactiques. En effet Oyéwolé (1990) suivant l'évolution des microorganismes au cours d'un rouissage naturel, indique qu'on a 10^6 ufc/ g de bactéries lactiques et 10^3 spores/ g de manioc de moisissures au début de la fermentation. Ces proportions sont respectées afin de se rapprocher le plus des conditions naturelles.

II-2-2 *Rhizopus oryzae*

Des spores de *Rhizopus oryzae* ont été utilisées comme inoculums. Pour la récolte des spores, des flacons à large ouverture ont été lavés, séchés, bouchés à l'aide du coton cardé, et stérilisés. De la gélose PDA a été alors introduite et après la prise en masse, des spores de moisissures, préalablement isolées du manioc, sélectionnées et conservées en tubes inclinés, ont été disséminées sur la surface de notre gélose. Après 72 heures d'incubation, les spores ont été récoltées par immersion et introduites dans des tubes stériles, un dénombrement a été alors réalisé par comptage à la cellule de Malassez. Des concentrés de 10^3 spores/ g de manioc ont été constitués pour les mêmes raisons évoquées un peu plus haut.

II - 3- Protocole de rouissage.

Après prélèvement aux champs, les racines non altérées ont été lavées, épluchées, puis sectionnées en pièces de 4 cm de long et 10 cm de diamètre à l'aide d'un cutter de labo. Elles ont été stérilisées pendant 15 minutes avec du chlorure de

mercure à 1% dans l'éthanol à 70 % (Okafor *et al.*, 1984) puis, rincées et immergées dans de l'eau distillée stérile (Fig. 9).

Un premier lot de 50 grammes de pulpe stérile, a été homogénéisé dans 500 ml d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 M pendant 3 mn puis, après broyage, l'homogénéisât a été centrifugé à $500 \times g$ pendant 3 minutes, le surnageant a été filtré et le pH ajusté à 6,8 avec du NaOH 0,1 N. Cette préparation a été conservée au réfrigérateur pour dosage des paramètres physico-chimiques et biochimiques (enzymes endogènes et cyanures totaux) et constitue le lot témoin avant rouissage (Fig. 5).

Un second lot de 50 grammes de pulpe précédemment préparé et stérilisé, a été introduit dans un erlen d'un litre et complété à 450 ml par de l'eau distillée stérile, puis inoculé à l'aide de cultures pures. L'inoculation est réalisée suivant les proportions obtenus au cours d'une fermentation naturelle soit de 10^6 u/ g de pâte pour *Lactobacillus plantarum*, ou 10^3 spores/ g de pâte pour *Rhizopus oryzae*. L'incubation est faite aux températures et temps déterminés par le plan expérimental. Ce lot constitue le témoin de rouissage avec les ferments (Fig. 5).

Un dernier lot de 50 grammes de pulpe précédemment préparé et stérilisé, a été introduit dans un erlen d'un litre et complété à 450 ml par de l'eau distillée stérile, puis inoculé avec 50 ml d'eau distillée stérile à la place de l'inoculum. L'ensemble comme précédemment, a été incubé aux températures et temps déterminés par le plan expérimental. Ce lot constitue le témoin de rouissage stérile (Fig. 5).

Cinquante autres grammes de pulpe précédemment préparés et stérilisés ont été repartis dans des erlens d'un litre et complétés à 500 ml par de l'eau de pluie.

L'ensemble a été incubé à température ambiante, et sert de témoin de fermentation naturel.

Des prélèvements ont été effectués toutes les 12 heures pour analyses physico-chimiques et biochimiques, pendant 108 heures (Fig. 5).

II-4- Analyses physico-chimiques

II-4-1) Indice de pénétrromètrie

Le protocole utilisé pour suivre le ramollissement des racines a été l'indice de pénétrromètrie (Ampe *et al.*, 1994). Six pièces de manioc de 4 cm de long et 10 cm de diamètre ont été prélevées de manière aléatoire dans les essais témoins naturels et stériles toutes les 12 heures de rouissage pour les essais de microorganismes. L'indice de pénétrromètrie a été ensuite mesuré 5 fois sur chaque pièce en utilisant un pénétrromètre de type PRN 10.

II-4-2) pH des racines en fermentation.

Le pH des racines a été évalué selon le protocole de Nartey (1968). Dix grammes de racines en fermentation ont été prélevés toutes les 12 heures de manière aléatoire dans les différents essais témoins naturels et stériles au cours du rouissage pour les échantillons inoculés. Chaque prélèvement a été broyé au Moulinex et homogénéisé dans 100 ml d'eau distillée. Le mélange a été centrifugé à 500 g pendant 5 min et le surnageant complété à 200 ml avec de l'eau distillée pour la détermination du pH (pH mètre p 307 consort)

II-4-3) Dosage des cyanures totaux.

Le dosage des cyanures totaux a été réalisé selon le protocole décrit par Sylvestre et Arreaudeau (1983)

Préparation du matériel d'analyse

Dix grammes de tubercules en fermentation ont été prélevés toutes les 12 heures dans les différents essais témoins naturels et stériles et après 48 heures de rouissage pour les essais inoculés. Ces prélèvements ont été broyés puis homogénéisés dans 50 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1 M pendant trois minutes. L'homogénéisat a été filtré sur papier watman N°5 et le filtrat obtenu, ajusté à pH 6,8 avec du NaOH 0,1N. Ce dernier a été ensuite centrifugé à 500 g pendant 3 mn, et le surnageant, a été conservé à 4°C pour les différentes analyses.

Méthodologie

La méthode par titration que nous avons utilisée ici est la méthode de Sylvestre et Arreaudeau (1983) décrit précédemment.

II-4-4) Dosage des protéines totales :

Les protéines totales ont été évaluées par la méthode modifiée de Hantzsch (Devani *et al.*, 1989)

Préparation du matériel.

Cinq mg d'échantillon de manioc ont été transférés dans les Kjeldahl, puis, 1 g de sulfate de potassium, 50 g d'oxyde de mercure et 2 ml d'acide sulfurique concentré ont été additionnés. Le mélange a été chauffé jusqu'à disparition de la matière organique, puis refroidi à température ambiante; le digestat a été dilué avec 10 ml d'eau et laissé au repos. La solution a été alors transférée dans une fiole de 100 ml et ajusté avec le même solvant.

Dosage de l'azote total.

Des aliquots du digestat contenant de 20 à 100 μ g d'azote ont été transférés dans une série de tubes coniques de 50 ml. Puis, 3 ml d'acétate de sodium et 4 ml de solution réactante ont été additionnés à chacun et bien mélangés. Les tubes ont été immergés dans un bain marie à 90°C pendant 15 mn et refroidis à température ambiante (30°C environ). Le mélange a été alors transféré dans des fioles de 25 ml et ajusté avec le même solvant. L'absorbance a été mesurée à 412 nm contre Blanc.

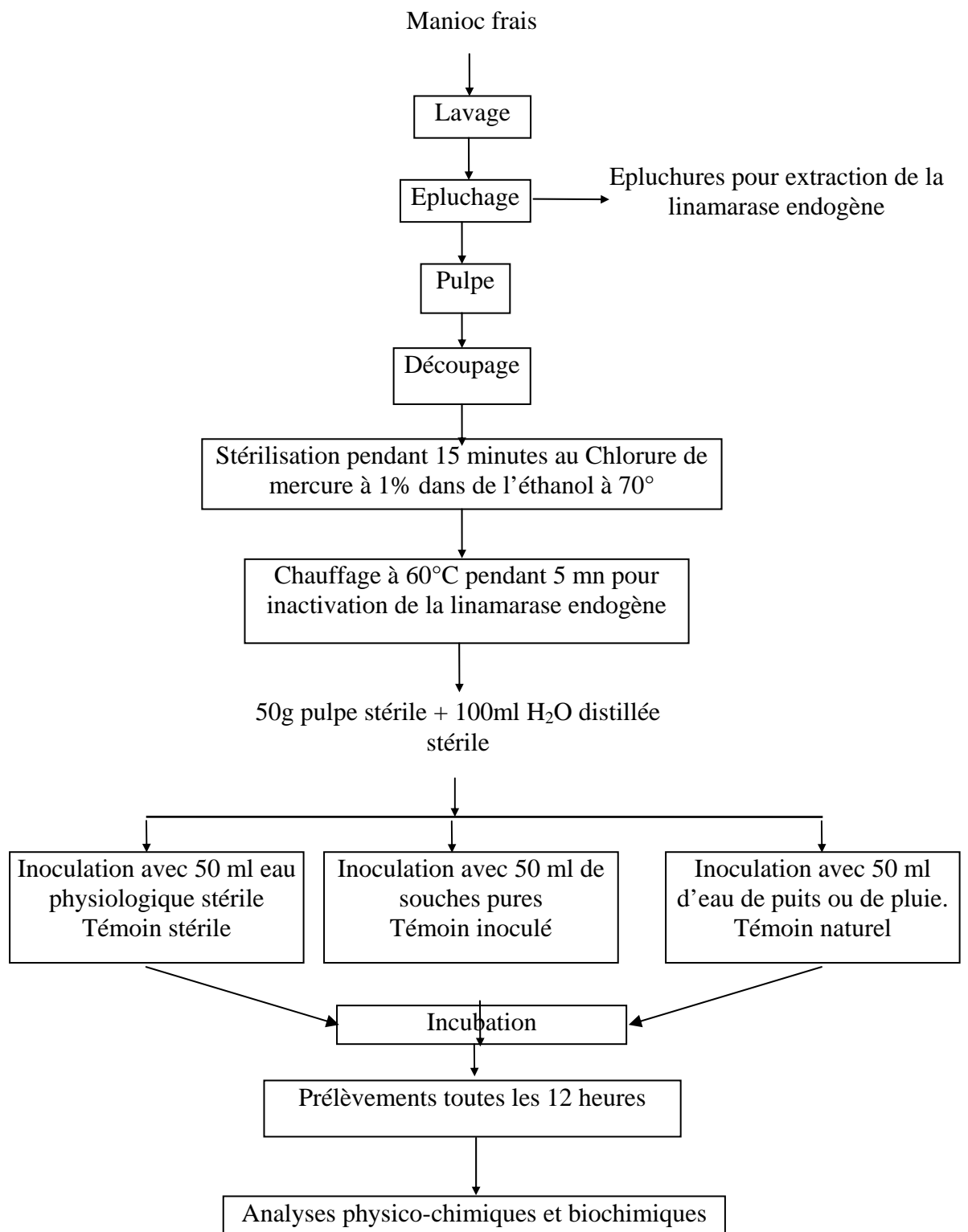


Fig. 5 : méthodologie d'évaluation de l'activité des souches isolées

III- Résultats

III-1- Evolution du potentiel d'hydrogène au cours du rouissage naturel et du rouissage avec les différentes formulations du ferment.

Le pH des racines au début du rouissage se situe autour de $6,9 \pm 1,2$.

Au cours d'un rouissage naturel, l'on peut noter une diminution du pH dès les premières heures, de fermentation. Celui-ci passe de $6,9 \pm 1,2$ à $5,9 \pm 1,7$ dès la 12^{ème} heure de culture pour se stabiliser aux environs de $3,1 \pm 1,5$ après 72 heures, de rouissage (Fig. 6).

Le rouissage stérile, se caractérise par une diminution du pH non significative par rapport aux autres essais, ceci pendant toute la durée du rouissage. Avec des valeurs se trouvant aux environs de pH $6,9 \pm 1,2$ du début à la fin de la fermentation.

Les variations du pH du manioc observées en présence des cultures pures des microorganismes, révèlent les faits suivants :

-Pour *Lactobacillus plantarum* utilisé seul comme ferment, pour une biomasse initiale de 10^6 ufc/ml en culture pure, une diminution brutale du pH dès les premières heures du rouissage (12 heures), celui-ci se stabilisant aux environs de pH 3 après 24 heures de fermentation (Fig. 6).

-Une baisse moins rapide mais assez importante en présence de la culture mixte des deux souches avec des valeurs de pH $4 \pm 1,7$ après 24 heures de rouissage pour se stabiliser aux environs de pH $3,8 \pm 1,2$ après 48 heures de rouissage

-Une diminution moins accentuée en présence de *Rhizopus oryzae* (Fig. 6). Cette baisse du pH a été régulière jusqu'à la 84^{ème} heure où elle se stabilise autour de pH4,9±1,4.

L'analyse des variances relatives aux moyennes indique qu'il existe une différence significative ($P < 0,05$) entre les rouissages avec chaque formulation du starter, comparativement aux rouissages stériles et naturels (Tableaux 9 et 10) de même que les formulations prises entre elles deux à deux. Le rouissage avec *Lactobacillus plantarum* est meilleur point de vue abaissement du pH que les autres (Tableau 10).

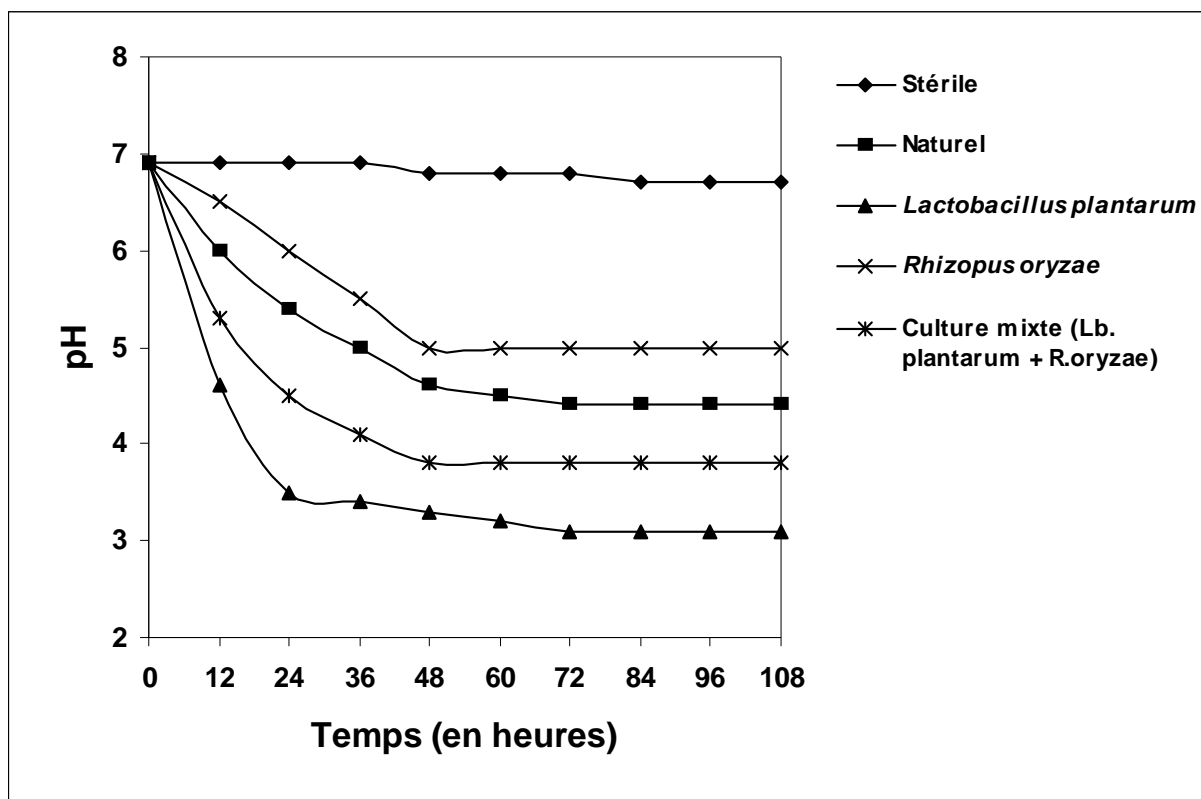


Fig. 6: Evolution du pH au cours du temps en fonction des inoculums.

Tableau 9 : Analyse des variances du pH des différentes formulations du starter au cours du temps

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	61,2031	4	15,3008	66,82	0,000
Within groups	9,16	40	0,229		
Total (Corr.)	70,3631	44			

Tableau 10 : Comparaison des valeurs du pH en fonction des inoculums

Method: 95,0 percent LSD			
	Count	Mean	Homogeneous Groups
Lb. plantarum	9	3,37778	X
Starter mixte	9	4,07778	X
Naturel	9	4,78889	X
R.oryzae	9	5,33333	X
Sterile	9	6,8	X
Contrast			Difference +/- Limits
Lb. plantarum - Naturel			*-1,41111 0,455927
Lb. plantarum - R.oryzae			*-1,95556 0,455927
Lb. plantarum - Starter mixte			*-0,7 0,455927
Lb. plantarum - Sterile			*-3,42222 0,455927
Naturel - R.oryzae			*-0,544444 0,455927
Naturel - Starter mixte			*0,711111 0,455927
Naturel - Sterile			*-2,01111 0,455927
R.oryzae - Starter mixte			*1,25556 0,455927
R.oryzae - Sterile			*-1,46667 0,455927
Starter mixte - Sterile			*-2,72222 0,455927

* denotes a statistically significant difference.

*Différence significative pour $P < 0,05$

III 2- Ramollissement au cours du rouissage

L'un des objectifs de ce travail visant à réduire la durée du rouissage, nous avons comparé le ramollissement de nos échantillons de manioc pendant 108 heures de fermentation en présence de nos différentes souches en culture pure d'une part et en fermentation naturelle et stérile.

Le suivi du ramollissement au cours du temps, effectué par la mesure de l'indice de pénétrométrie (Ampe *et al.*, 1995) indique que lors du rouissage naturel, la pulpe du manioc a été peu affectée durant les 36 premières heures de rouissage avec un indice de pénétrométrie variant de $1,5 \pm 0,6 \text{ mm/5s}$ (début de fermentation) à $2,9 \pm 0,8 \text{ mm/5s}$ (36 heures). Ce n'est qu'à partir de la 36^{ème} heure que l'on a observé un ramollissement, celui-ci se caractérisant par un indice variant de $4,9 \pm 0,5 \text{ mm/5s}$ des la 36^{ème} heure de fermentation, à $10 \pm 0,6 \text{ mm/5s}$ d'indice obtenu à la 84^{ème} heure, temps au bout duquel on n'observe plus de variations significatives quel que soit le ferment utilisé.

L'essai avec *Lactobacillus plantarum* se manifeste par un très léger ramollissement survenant autour de la 36^{ème} heure avec une pénétrométrie de $3 \pm 1 \text{ mm/5s}$. Cet indice évolue par la suite jusqu'à se stabiliser à $3,5 \pm 1 \text{ mm/5s}$ de la 48^{ème} heure à la fin du rouissage (Fig. 7).

Au cours du rouissage stérile, l'indice de pénétrométrie varie peu au cours des 36 premières heures avec un indice de pénétrométrie variant de $1,5 \pm 0,5 \text{ mm/5s}$ à $1,9 \pm 1 \text{ mm/5s}$. A partir de ce moment, on observe un léger ramollissement allant de $1,9 \pm 0,7 \text{ mm/5s}$ à $2,9 \pm 0,9 \text{ mm/5s}$ en fin de rouissage.

Un rouissage avec *Rhizopus oryzae*, indique un démarrage du ramollissement dès la 24^{ème} heure avec un indice de $1,6 \pm 0,5 \text{ mm/5s}$ à $13,2 \pm 2,1 \text{ mm/5s}$ après 108 heures de rouissage. Il faut par ailleurs noter qu'un indice de $12,5 \text{ mm/5s}$ est considéré comme fin de fermentation (Oyéwolé, 1990).

Le rouissage par la culture mixte indique un ramollissement aussi rapide que la précédente, avec dès la 12^{ème} heure, un indice de pénétrométrie de $2,7 \pm 1,2 \text{ mm/5s}$, et dès la 48^{ème} heure on a déjà $10,2 \pm 1 \text{ mm/5s}$ valeur obtenue après 108 heures de rouissage naturel et 36 heures de rouissage avec *Rhizopus oryzae* (Fig. 7) seul. A partir de la 60^{ème} heure on observe déjà la fin de la fermentation (Fig. 7).

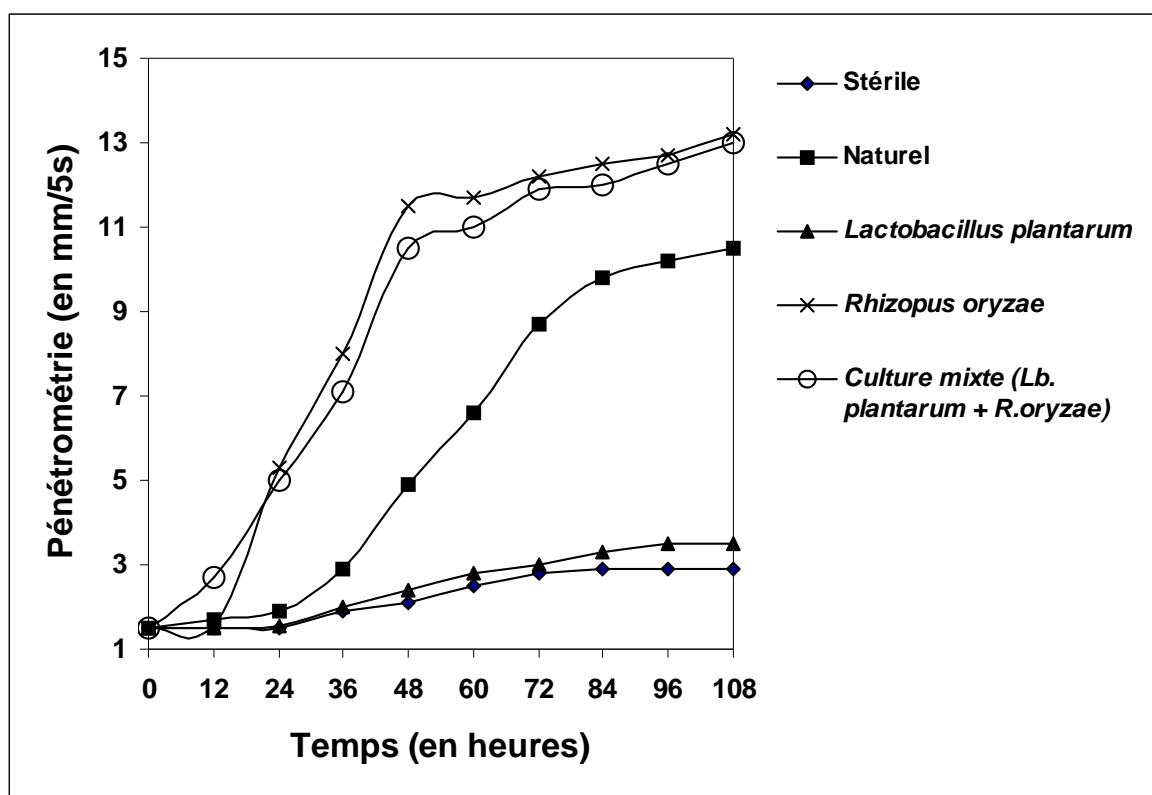


Fig. 7 : Ramollissement du manioc au cours des essais avec différentes formulations du ferment

La comparaison des moyennes indique globalement qu'il existe une différence significative ($P < 0,05$) entre les ramollissements obtenus en fonction des inoculums au cours du temps (Tableau 11).

Tableau 11 : Analyse des variances du ramollissement obtenu par différentes formulations du starter.

Source	Somme des carrés	df	Moyenne des carrées	F	P
Entre groupes	469,39	4	117,348	13,31	0,0000
Dans les groupes	352,628	40	8,81569		
Total (Corr.)	822,018	44			

Les observations de coupes de racines en fermentation (Photo 6) indiquent que le ramollissement obtenu ici n'est pas seulement dû au stress physique, mais à la lyse des parois des cellules végétales des racines composées de pectine et de cellulose. Cette lyse est l'œuvre des enzymes microbiens (Photos 6)

En effet, la pectine est, le constituant majeur de la paroi cellulaire, et responsable de la rigidité de la pulpe du manioc (Bombily, 1995). Les observations de coupes microscopiques réalisées sur quelques tranches de tubercules, indiquent clairement que le ramollissement obtenu ici n'est pas le fait d'un stress physique qui aurait eu pour effet d'aplatir les cellules et les entasser les unes au dessus des autres (Photo 6). On observe plutôt ici une dissociation progressive du tissu cellulaire qui fait penser à une désintégration de structures (Photos 6).

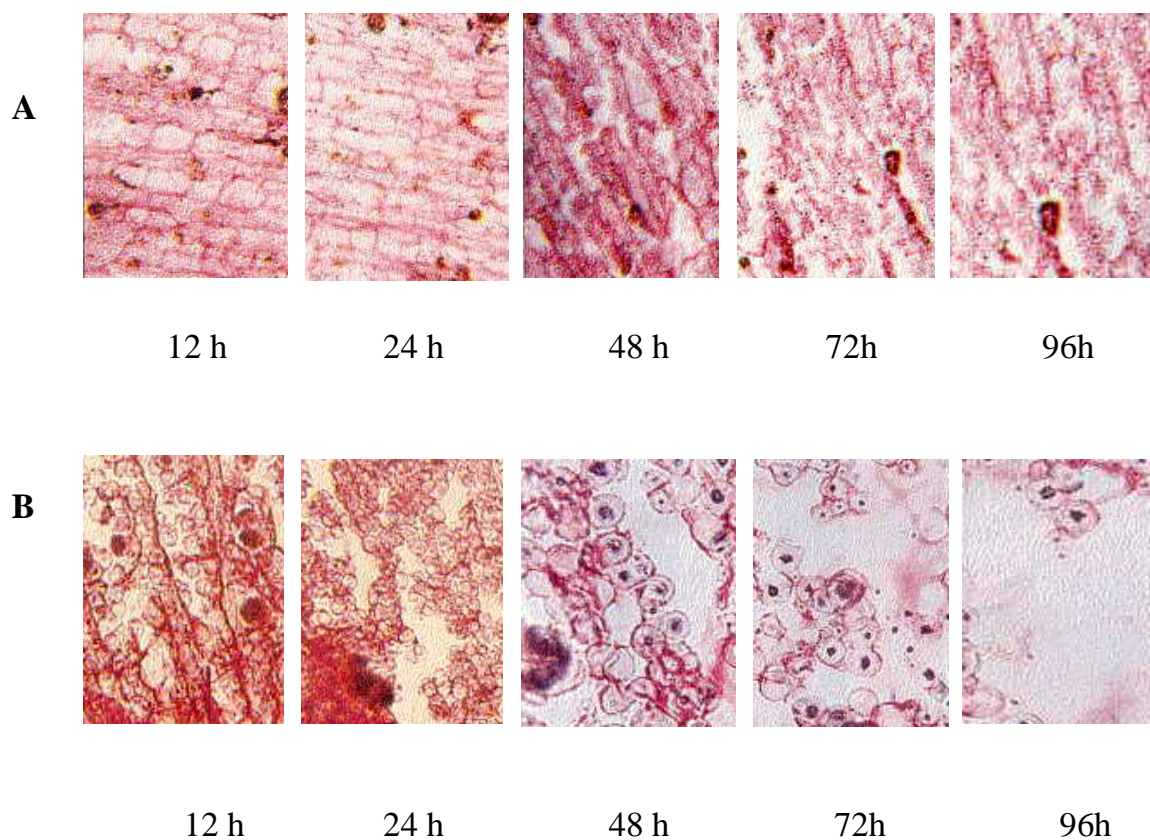


Photo 6 : Observations microscopiques (X1000) de coupes de tranches de manioc au cours du rouissage stérile (A) et du rouissage avec le starter (B)

La comparaison des moyennes de ramollissement (Tableau 12) indique que l'utilisation de *Lactobacillus plantarum* comme ferment induit un ramollissement statistiquement différent des rouissage naturel, rouissage avec le starter mixte, et rouissage avec *Rhizopus oryzae*. Il n'existe par contre pas de différence significative entre les ramollissements dus à *Lactobacillus plantarum* et le ramollissement obtenu au cours du rouissage stérile.

Tableau 12 : Comparaison des moyennes de ramollissement en fonction des inoculums (Méthode: 95,0 percent LSD)

Contraste	Différence	+/- Limites
<i>Lb. plantarum</i> - Naturel	*-3,73889	2,82882
<i>Lb. plantarum</i> - <i>R.oryzae</i>	*-7,23333	2,82882
<i>Lb. plantarum</i> - Starter mixte	*-6,90556	2,82882
<i>Lb. plantarum</i> - Stérile	0,283333	2,82882
Naturel - <i>R.oryzae</i>	*-3,49444	2,82882

*Différence significative pour $P < 0,05$

III 3- Evolution des Cyanures totaux au cours du rouissage

Au cours du rouissage naturel, près du tiers des cyanures totaux ont été éliminés durant les 24 premières heures. En effet leurs taux diminuent de 170 ± 36 ppm à 125 ± 14 ppm (Fig. 8), soit une réduction d'environ 26,47% et, ce taux passe à environ 118 ± 13 ppm après 48 heures pour se stabiliser à 100 ± 11 ppm après 84 heures de rouissage.

Au cours du rouissage stérile, on note juste une légère diminution des glucosides pendant les 12 premières heures avec un taux passant de 170 ± 36 ppm à 165 ± 14 ppm. Dès lors, la dégradation a été stoppée et on a noté une sorte de stabilisation du taux de glucosides résiduels autour de cette valeur jusqu'en fin de rouissage (108^{ème} heure). En comparant le rouissage stérile au rouissage naturel, (Fig. 8) il apparaît une faible élimination des cyanures totaux lors du rouissage stérile avec une baisse de près de 14,71% après 108 heures de rouissage stérile alors que lors du rouissage naturel on a pour le même temps de rouissage une réduction de 64% environ.

Le rouissage avec la souche de *Lactobacillus plantarum* utilisée comme ferment indique une diminution du taux résiduel de glucosides totaux, dont le taux passe de 170 ± 33 ppm, à 120 ppm après 24 heures. Taux autour duquel l'évolution des glucosides résiduels se stabilise jusqu'en fin de rouissage.

Le rouissage avec *Rhizopus oryzae* indique une réduction de 21% au bout de 12 heures de fermentation, puis une légère baisse vers la 48^{ème} heure avec un taux résiduel de 143 ppm, valeur autour de laquelle ce taux se stabilise jusqu'en fin de rouissage.

L'utilisation de la culture mixte induit comme précédemment, une légère diminution dès les 12 premières heures. Le taux résiduel passe en effet de 170 à 145 ppm, valeur qui reste inchangée jusqu'en fin de fermentation.

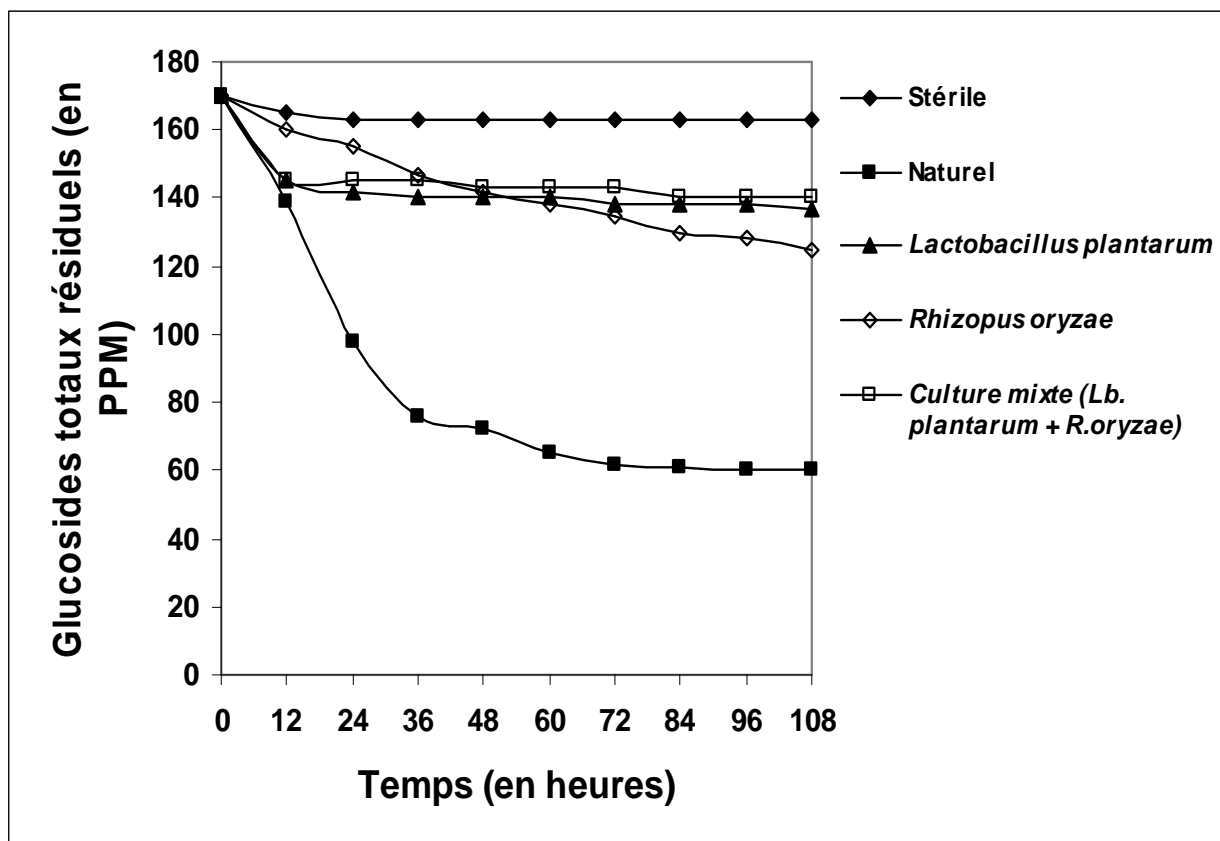


Fig. 8 : Evolution des cyanures totaux au cours des divers essais

Globalement pris, après comparaison des moyennes en fin de rouissage, on note que les rouissages, avec *Lactobacillus plantarum*, d'une part et avec *Rhizopus oryzae* d'autre part ne sont pas différents au seuil de 5% (Tableau 13 et 14) de même que *Lactobacillus plantarum* d'une part et le Starter mixte d'autre part.

La comparaison par contre des combinaisons : *Lactobacillus plantarum* et rouissage naturel, *Lactobacillus plantarum* et le rouissage Stérile, le rouissage naturel et le rouissage avec *Rhizopus oryzae* sont différentes ($P < 0,05$).

Tableau 13 : Analyse des variances de la dégradation des glucosides obtenus par différentes formulations du starter.

Source	Somme des carrés	Dl	Moyenne des carrés	F	P
Between groups	11105,8	4	2776,44	41,46	0,0000
Within groups	2678,67	40	66,9667		
Total (Corr.)	13784,4	44			

Tableau 14 : Comparaison des moyennes de glucosides totaux résiduelles en fonction des inoculums (Méthode: 95,0 percent LSD)

Contrast	Différence	+/- Limites
<i>Lb. plantarum</i> - Naturel	*26,0	7,79662
<i>Lb. plantarum</i> - <i>R.oryzae</i>	-0,222222	7,79662
<i>Lb. plantarum</i> - Starter mixte	-2,88889	7,79662
<i>Lb. plantarum</i> - Sterile	*-23,4444	7,79662
Naturel - <i>R.oryzae</i>	*-26,2222	7,79662

*Différence significative pour $P < 0,05$

III 4 Evolution des protéines totales au cours du rouissage.

Les protéines totales dans la racine déjà en faible quantité au départ, ($1 \pm 0,5$ %), ont été presque stables au cours d'un rouissage stérile, et avec *Lactobacillus plantarum*.

Au cours du rouissage naturel par contre, on observe une légère hausse dès la 72^{ème} heure de rouissage avec des taux allant de $1,3 \pm 0,3$ % dès la 60^{ème} heure, à $3 \pm 0,9$ % à partir de la 72^{ème} heure (Fig. 9)

Au cours des rouissage avec *Rhizopus oryzae* et en culture mixte, on observe une nette amélioration du taux de protéines totales, avec des valeurs de $3 \pm 0,5$ % dès la 36^{ème} heure, à $11 \pm 1,3$ % à la 120^{ème} heure pour le rouissage avec *Rhizopus oryzae*, et de $4 \pm 0,9$ % dès la 36^{ème} heure, à $11,5 \pm 1,2$ % à la 120^{ème} heure de rouissage s avec le starter mixte (Fig. 9).

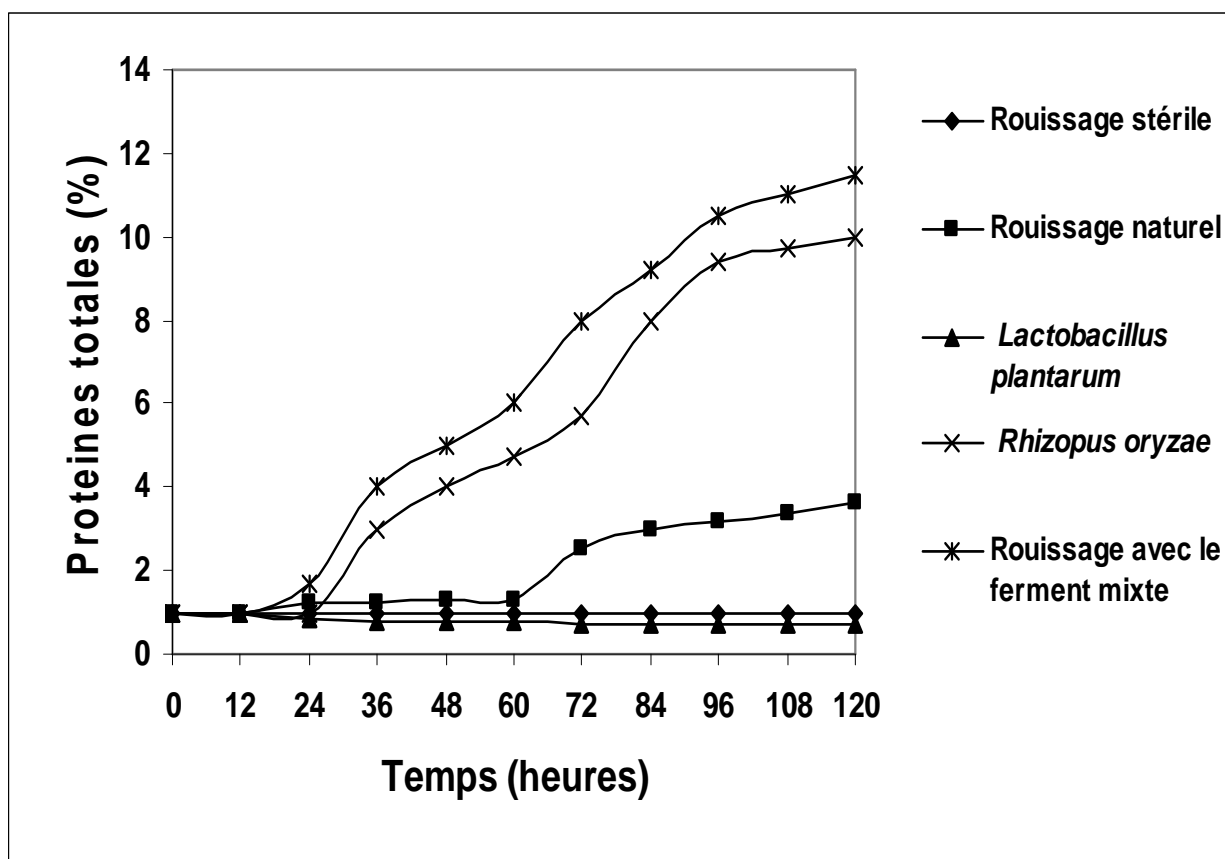


Fig. 9 : Evolution des protéines totales au cours des essais de rouissage naturel, stérile et avec les trois compositions de notre ferment

Une inoculation par des micro-organismes en culture pure indique globalement, qu'il n'existe pas de différence significative pour $P < 0,05$ (Tableaux 15 et 16) entre le rouissage avec *Rhizopus oryzae* et un rouissage avec le starter mixte, alors qu'il existe une différence significative, entre l'utilisation de *Lactobacillus plantarum*, et le starter mixte (Tableaux 15 et 16). Il n'existe pas de différence significative au seuil de 0,05 entre le rouissage stérile et le rouissage par *Lactobacillus plantarum* (Tableau 15 et 16).

Tableau 15 : Analyse des variances de l'augmentation des protéines obtenues par différentes formulations du starter.

Variations	Somme des carrés	DI	Moyenne des carrés	F	P
Entre les groupes	308,518	4	77,1295	13,98	0,0000
Dans les groupes	248,233	45	5,51628		
Total (Corr.)	556,751	49			

Tableau 16 : Comparaison des moyennes de glucosides totaux résiduelles en fonction des inoculums (Méthode: 95,0 percent LSD)

Contraste	Différence	+/- Limites
<i>Lb.plantarum</i> - Naturel	-1,39	2,11554
<i>Lb.plantarum</i> - <i>R.oryzae</i>	*-4,89	2,11554
<i>Lb.plantarum</i> - Starter mixte	*-6,001	2,11554
<i>Lb.plantarum</i> - Stérile	-0,176	2,11554
<i>Naturel</i> - <i>R.oryzae</i>	*-3,5	2,11554
Naturel - Starter mixte	*-4,611	2,11554
Naturel - Stérile	1,214	2,11554

*Différence significative pour $P < 0,05$

IV- Discussion

L'inoculation du manioc par le ferment composé de *Lactobacillus plantarum* seul ou associé à *Rhizopus oryzae* induit une baisse rapide du pH du milieu de rouissage. Cette baisse peut être le fait des acides organiques produits acide lactique, notamment (Chuzel, 1990). En effet, l'amidon du manioc est dégradé par l' α -amylase bactérienne. En effet l'étude du profil enzymatique de cette bactérie réalisée au cours du chapitre précédent, nous indique que cette souche a une activité amylolytique non négligeable. Giraud *et al.*, (1995), indiquent à cet effet que l'activité amylolytique observée au cours de la fermentation avec une souche de *Lactobacillus plantarum* A6 permet de transformer directement l'amidon de manioc en acide lactique. Cette observation vient conforter l'hypothèse que nous avons émise quant à la relation entre les acides organiques issus du métabolisme des microorganismes et la baisse du pH au cours du rouissage. Cette baisse du pH aurait un effet positif dans le contrôle des pathogènes en début de fermentation en inhibant les microorganismes pathogènes (Giraud *et al.*, 1995) et ainsi permettre un meilleur contrôle du rouissage. En effet, cette microflore épiphyte inhibée par les acides organiques serait responsable des fluctuations observées dans les dérivés du manioc fermenté (Bokanga, 2001). L'utilisation de *Lactobacillus plantarum* serait dès lors souhaitable pour le contrôle de la fermentation par le starter que nous voulons mettre au point. L'obtention des dérivés de manioc fermentés stables serait donc dès lors possible.

Le ramollissement obtenu ici n'est pas seulement dû au stress physique (Werstey, 1979) mais, l'œuvre des moisissures et des levures. Ce ramollissement est

dû à la lyse des parois des cellules végétales des racines composées de pectine et de cellulose. La présence d'activité pectinasique importante indique clairement que ces pectinases sont à l'origine du ramollissement. Les pectinases dosées sont comme nous l'avons noté, composées de deux types d'enzymes (PME, PL) dont l'origine végétale et bactérienne a été depuis précisée (Ampe et Brauman, 1994). L'analyse des résultats obtenus en ce qui concerne le ramollissement au cours de nos différents essais, nous indiquent que l'on obtient un meilleur ramollissement par utilisation du ferment constitué en partie ou totalement de *Rhizopus oryzae*. En nous référant aux profils enzymatiques obtenus au cours du chapitre précédent, ce microorganisme a une activité pectine hydrolase et polygalacturonase assez importantes. Kéléké *et al.*, (1990) indiquent que ces deux enzymes sont les plus incriminés dans les phénomènes de ramollissement obtenus lors de fermentations du manioc. La présence de pectinesterase dans le rouissage naturel a déjà été signalée (Oyewole et Odunfa, 1990) et lors de l'inoculation artificielle du manioc par des *Corynebacteriums spp.* (Okafor *et al.*, 1984). Cette microflore pectinolytique, du fait de l'importance de la production de la pectine lyase, représente, à priori une flore déterminante dans le processus de ramollissement du manioc au cours du rouissage.

La réduction des glucosides cyanogénétiques est plus importante au cours du rouissage naturel, comparativement aux rouissages contrôlés par les différentes formulations du starter utilisé. Certains auteurs pensent que la dégradation des glucosides au cours de la fermentation serait liée exclusivement à la β -glucosidase endogène (Maduagwu, 1983). Les essais de fermentations naturels et stériles auraient dû être similaires dans ce cas, au cours de nos expérimentations, ce qui n'est pas le

cas. On observe contrairement à cela, un blocage du processus de dégradation des glucosides au cours du rouissage stérile dès la 12^{ème} heure de fermentation ce qui induirait que la β -glucosidase endogène est épuisée à ce moment. Ce fait est conforté par les observations d'Oyewole et Odunfa (1992) qui affirment que la linamarase endogène est épuisée dès la 12^{ème} heure de fermentation. L'intervention d'une β -glucosidase exogène (d'origine microbienne) est dès lors admise pour expliquer la poursuite du processus de dégradation observé au cours d'une fermentation naturelle. La différence entre le rouissage stérile et le rouissage naturel, n'étant que la fermentation qui elle-même est le fait des microorganismes. Ces observations sont confortées par le fait que plusieurs auteurs (Ofuya et Najiorfor, 1989, Oyewole 1990, et Giraud *et al.*, 1995) affirment que la microflore fermentaire épiphyte du rouissage naturel est déterminante pour la dégradation des glucosides cyanogénétiques du manioc au cours du rouissage naturel. Si cette dégradation est effective au cours du rouissage naturel, on n'observe hélas pas la même chose au cours du rouissage avec les starters. Or ceci aurait aussi dû être le cas pour l'utilisation de nos starters microbiens, notamment ceux des starters comportant en partie ou pour tout, la souche de *Lactobacillus plantarum*. Cette observation est paradoxale, car nous nous serions attendus à avoir un meilleur taux de réduction au cours du rouissage avec *Lactobacillus plantarum*. Cette dernière étant productrice de β -glucosidase, enzyme susceptible de dégrader la linamarine des tubercules (Mpong *et al.*, 1990). Nous émettons comme hypothèse qu'un blocage du processus de dégradation comme celui décrit par Nartey (1978) et qui serait due à une baisse rapide du pH est responsable du phénomène observé ici. En effet la baisse de pH au cours de nos essais indique des pH

inférieurs à 5,5 après 12 heures de rouissage pour tous les essais excepté l'essai de rouissage naturel. Une analyse des résultats obtenus au cours de nos essais indique lors des rouissages contrôlés avec les différentes formulations du starter, une baisse significative des glucosides totaux du début de la fermentation à la 12^{ème} heure. Après la 12^{ème} heure, on a l'impression que ce processus s'arrête brusquement. Or l'on constate, que le pH à ce moment est inférieur à 5,5 pour tous les essais, excepté l'essai naturel. Cette baisse de pH pourrait donc être la cause de l'arrêt du processus de dégradation dès la 12^{ème} heure au cours des fermentations contrôlées.

La présence d'une activité amylasique au cours du rouissage a été déjà mentionnée par certains auteurs (Kéléké, Koumpolo et Brauman, 1995 ; Oyéwolé, 1992). Ces auteurs attribuent cette activité aux bactéries amylolytiques aérobies dont la disparition au cours des premières heures du procédé expliquerait la baisse brutale de l'activité amylasique au cours du rouissage naturel. Au cours de ce travail, l'évolution de la microflore amylolytique totale suit une cinétique semblable à celle de l'activité enzymatique totale, contrairement à ce qu'affirme Kéléké *et al*, (1995), nous remarquons qu'il existe une similitude entre l'activité amylasique dans les racines du manioc et la microflore dénombrée. L'amylase endogène active au début du processus, permettrait de dégrader l'amidon en sucres simples fermentescibles utilisés comme substrat par la microflore amylolytique. Cette microflore lors de leurs métabolismes produirait de l'amylase qui prendrait le relais pour la dégradation de l'amidon du manioc en sucres fermentescibles. L'épuisement de l'amylase au cours du rouissage stérile conforte cette hypothèse car pendant un rouissage naturel ou interviennent les micro-organismes, cette activité est maintenue.

V- Conclusion

Au terme de cette partie, nous nous rendons compte que les processus de dégradation des glucosides cyanogénétiques, et de ramollissement, lors du rouissage du manioc sont fortement influencés par la microflore mixte exogène, composée de *Lactobacillus plantarum* et de *Rhizopus oryzae*, microflore que nous avons par ailleurs retenue comme ferment pour la suite du travail.

Une utilisation en culture pure des micro-organismes sélectionnés indique une acidification plus rapide pour le ferment composé de *Lactobacillus plantarum*, un ramollissement plus rapide et un taux de protéines plus élevé pour le ferment composé de *Rhizopus oryzae*.

Alors que le rouissage naturel est meilleur point de vue dégradation des composés cyanés.

Le ferment mixte (10^6 ufc/g manioc frais de *Lactobacillus plantarum* et 10^3 spores/g manioc frais de *Rhizopus oryzae*) permet de bénéficier de la plupart des effets recherchés au cours de la conduite d'une fermentation du manioc:

- une acidification intermédiaire ($\text{pH} 3,8 \pm 0,7$), qui pourrait induire l'inhibition et la multiplication des pathogènes et ainsi assurer une bonne qualité hygiénique, et une stabilité des produits finis
- un taux de protéines acceptable (5%)
- un ramollissement plus rapide.

Le ferment mixte composé de 10^6 ufc/g manioc frais de *Lactobacillus plantarum* et 10^3 spores/g manioc frais de *Rhizopus oryzae* a été retenu comme starter pour la suite du travail.

L'objectif relatif à la réduction des composés cyanés n'ayant pas été atteint, il conviendra de trouver un moyen de contourner ce problème avant de valider le ferment.

Chapitre 4

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE, ET DU PH SUR L'ACTIVITE DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ET *RHIZOPUS ORYZAE* AU COURS DU ROUISSAGE.

I- Introduction

Le starter mixte composé de *Lactobacillus plantarum* (10^6 ufc/g de manioc frais) et *Rhizopus oryzae* (10^3 ufc/g de manioc frais) a été choisi, pour sa potentialité à réaliser des bio transformations intéressantes des tubercules de manioc. Les deux souches utilisées en culture mixte, ont présentées les meilleures activités des principaux enzymes incriminés dans la transformation des tubercules de manioc que sont l' α -amylase, la β -glucosidase, et les pectinases (Oyéwolé, 1995). S'il est ressorti du chapitre précédent que ces activités sont importantes et suffisantes pour la bioconversion des racines de manioc, il subsiste encore quelques questions relatives à l'influence des facteurs externes sur ces activités. Nous avons en effet put observer que malgré l'activité β -glucosidase que présente le *Lactobacillus plantarum*, l'effet de dégradation des glucosides attendu n'est pas obtenu. L'hypothèse d'un blocage de l'activité au niveau de la cyanohydrine due à l'abaissement du pH (Cooke, Blake et Battershill 1978) a été admise. Il conviendra de vérifier cette hypothèse en testant à nouveau ces souches en faisant varier le pH et en dosant les composés cyanés libérés au lieu des glucosides totaux. De plus, les possibilités d'optimiser ces processus de bioconversion et de biodégradation des tubercules, doivent être envisagées. Avouampo *et al.*, (1995), Treche *et al.*, (1995), Ampe *et al.*, (1995) indiquent à cet effet

que les facteurs les plus influents sur la bioconversion du manioc sont le pH et la température. Ces facteurs pourraient avoir une influence sur les capacités de dégradation d'amidon, de production des enzymes recherchées et sur les processus biochimiques ayant cours lors de la fermentation du manioc. Il conviendra alors de dégager l'influence des facteurs température et pH sur l'activité du starter.

II- Matériel et Méthodes

1. Expérimentations

Un plan factoriel 6X6 soit 6 températures et 6 pH, a été utilisé. Un plan d'expérience a été élaboré à l'aide du logiciel NEMROD (Mathieu et Phan-Tan-Lu, 1980). La matrice résultante détermine les conditions expérimentales de 36 expériences, permettant de cribler les deux facteurs étudiés (températures et pH). L'effet de ces deux facteurs a été étudié sur la croissance microbienne et la production des enzymes (α -amylase, linamarase et pectinases) et la dégradation des composés cyanés.

2. Préparation des *inocula*

Les microorganismes retenus ont été repiqués sur milieux conventionnels que sont le MRS, pour les genres *Lactobacillus plantarum* et PDA pour *Rhizopus oryzae*. *Lactobacillus plantarum* a été produite dans un micro fermenteur de laboratoire de marque multigen, pendant 24 heures à 40°C, alors que les spores de *Rhizopus oryzae* sont produites dans des boîtes de pétri et incubées pendant 72 heures à 30°C. Des concentrés de 10⁶ufc/ml de *Lactobacillus plantarum* et 10³ufc/ml *Rhizopus oryzae* ont

étés réalisés pour servir d'inoculum initial dans les proportions de 1ml du starter mixte pour 1g de tubercules frais.

3. Influence de la température

L'influence de la température sur la croissance des cellules et la production des métabolites a été étudiée pour des températures variant de 25°C à 50°C. Six températures ont été retenues à savoir : 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C et 50°C. Cette gamme de températures a été choisie car elle couvre les températures optimales d'activité des levures et moisissures (25°C à 35°C), des lactobacilles (30-40°C), d'activité des enzymes linamarase (30-32°C) (Cooke *et al.*, 1978, Mpong *et al.*, 1990), température optimale d'activité de la pectine hydrolase (30°C), et la pectate lyase à (50°C) (Ampe *et al.*, 1995).

4. Influence du pH des milieux de culture des souches.

Six pH ont été testés sur les cellules : 4,5; 5,5 ; 6,5; 7,0; 7,5 et 8,0. Pour ce faire, les différents milieux de culture ont été préparés et les pH ajustés convenablement. Des inoculums précédemment apprêtés, y ont été introduits, dans chaque cas à raison de 10^6 ufc/ml de *Lactobacillus plantarum* et 10^3 ufc/ml *Rhizopus oryzae*. Le thermostat du fermenteur a été ajusté à la température optimale précédemment déterminée selon chaque germe. Le suivi de la croissance microbienne a été alors réalisé sur des prélèvements de 10 ml de la culture toutes les 12 heures pendant 96 heures, par dénombrement selon les méthodes classiques de numération microbienne (Buttiaux, Beerens, et Taquet, 1974).

5. Analyses biochimique et microbiologique.

5- 1- Extraction et dosage des enzymes

La linamarase a été extraite et dosée selon les méthodes décrites par Giraud *et al.*, (1992) en utilisant la linamarine comme substrat et en mesurant l'apparition du CN⁻. A 400 µl d'extrait, 100µl de linamarine à 50mM dans du tampon citrate 0,1 M sont ajoutés. Le pH de la réaction est ajusté à 6 et la température d'incubation est de 30°C.

Les pectinases ont été extraites par les méthodes décrites par Ampe *et al.*, (1995) et dosées par la méthode de Brauman *et al.*, (1995) et la méthode de Star *et al.*, (1977).

L'activité amylolytique a été dosée par la méthode d'Ampe *et al.*, (1995) par réaction à l'iode de l'amidon résiduel, et lecture de la densité optique à 620 nm.

5- 2 Dosage des sucres et composés cyanés résiduels

Les sucres fermentescibles résiduels ont été dosés par la méthode au DNS (Acide 3,5 - dinitrosalicylique), par ajout de cette solution à 1 ml du prélèvement et après chauffage dans de l'eau bouillante, refroidissement et lecture à 520nm contre blanc.

L'amidon résiduel a été dosé sur 0,1 ml de surnageant de centrifugation, comme décrit précédemment.

5- 3- Suivi de la croissance microbienne

Le suivi de la croissance microbienne a été réalisé par dénombrement sur milieu solide tel que décrit au chapitre précédent pour les bactéries et les moisissures.

6-Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels S-Plus 2000, Statgraphics Plus 3.0 pour office 2000. Les résultats de cinétiques expérimentales ont été analysés à l'aide de logiciels DACSL (Agin et Blau, 1982).

Les cultures en Batch ont été évaluées en utilisant les équations modifiées de Monod pour l'utilisation du substrat (disparition des sucres), la production des enzymes (α -amylase, linamarase et pectinases) et la croissance microbienne (Andrew 1968; Edwards, 1970).

III- Résultats

III- 1- Influence de la température sur la croissance des microorganismes sélectionnés

L'évolution de la biomasse de *Lactobacillus plantarum* indique globalement une mortalité cellulaire pour les températures de 25°C et 50°C, à la différence qu'à 25°C, la mortalité cellulaire débute après 48 heures environ de culture, alors qu'à 50°C dès la 12^{ème} heure, on observe une inflexion synonyme de mortalité (Fig. 10).

A 30°C et 35°C par contre, les vitesses de croissance des bactéries ont été globalement positives (Fig. 10), avec le démarrage effectif de la phase de multiplication, qui bien que tardif s'effectue pour la bactérie à 30°C à partir de la 36^{ème} heure, alors qu'elle a lieu un peu plutôt dès la 24^{ème} heure pour les cultures à 35°C.

A 40°C et 45°C on note globalement un démarrage rapide (dès la 12^{ème} heure) de la multiplication de la bactérie, on observe une vitesse de croissance relativement élevée, et une biomasse assez importante après 48 heures de culture seulement (Fig. 10).

Chez *Rhizopus oryzae*, on observe plutôt une bonne évolution de la biomasse à 25°C globalement, avec une phase de latence relativement longue (supérieure à 36 heures pour toutes les souches). Le même phénomène a été observé à 30°C, 35°C, et 40°C mais ici on notera que plus la température augmente, plus la phase d'adaptation est longue (Fig. 11);

A partir de 45 °C on note globalement un ralentissement de la croissance. Ainsi à 50°C on note que les vitesses de croissance pour toutes les deux souches ont été

négatives, ce qui se traduit par une mortalité cellulaire qui prend effet globalement dès la 36^{ème} heure de fermentation.

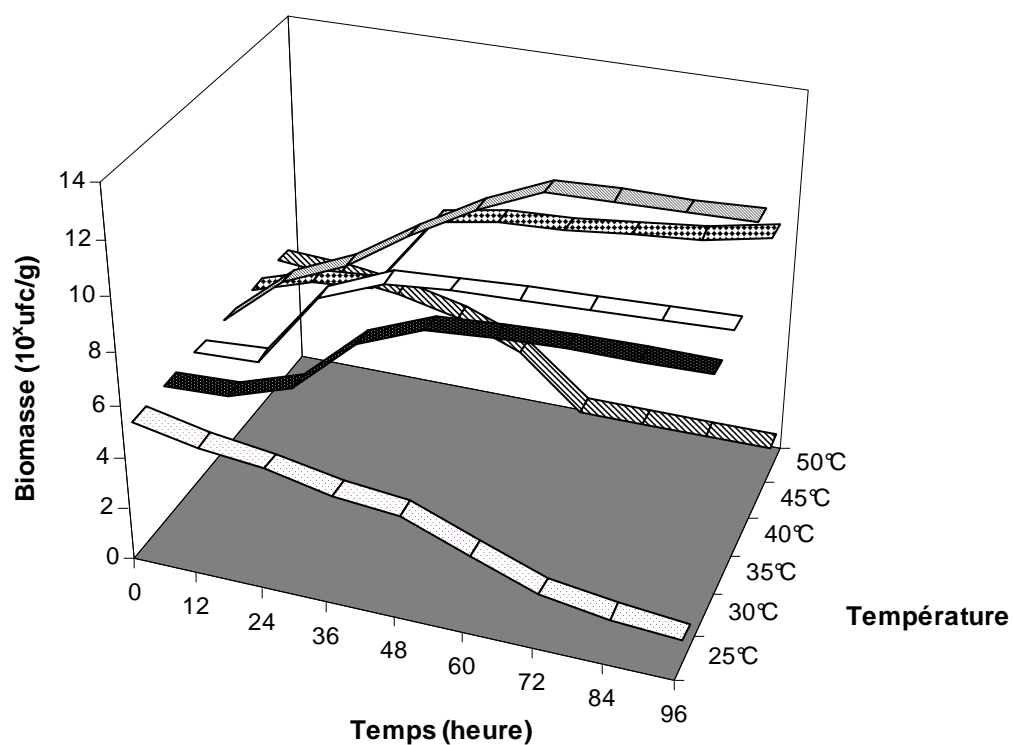


Fig.10 : Evolution de la biomasse de *Lactobacillus plantarum* au cours du temps en fonction des températures

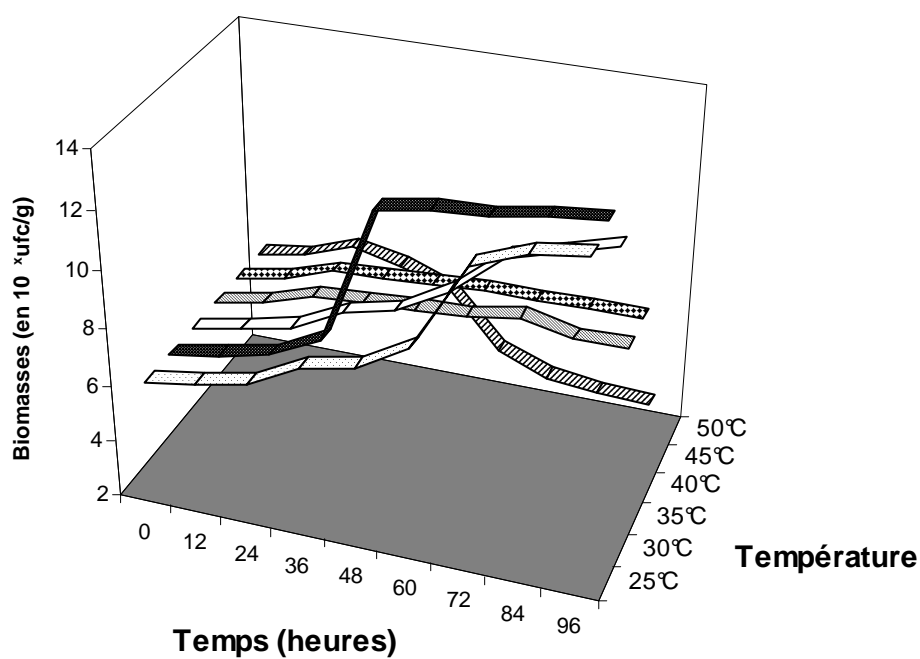


Fig. 11 : Evolution de la biomasse de *Rhizopus oryzae* au cours du temps en fonction des températures

On a la biomasse la plus importante à partir de la 48^{ème} heure de fermentation avec des valeurs de l'ordre de 10^{12} ufc/ml, chez *Lactobacillus plantarum* cultivés à 40°C. On observe globalement une différence significative ($P < 0,05$) pour les biomasses de moisissures et de levures, à partir de la 36^{ème} heure de fermentation, en ce qui concerne les températures de culture. Prises individuellement, après 12 heures de cultures pour des températures variables, on constate que, l'évolution de la biomasse n'est pas importante pour les températures de 25°C, 30°C, 35°C (Fig. 14), et se situe aux environs de 10^6 ufc/ml. On note par contre, une biomasse plus importante pour les températures comprises entre 35°C et 45°C pour le même temps, avec les plus forts taux chez *Lactobacillus plantarum* avec 10^8 ufc/ml, cultivé à 40°C (Fig. 10 et 12).

On remarquera globalement qu'on a les biomasses les plus importantes après 72 heures de fermentation pour des températures variant de 30°C à 45°C quelque soit le microorganisme incriminé.

Après 24 heures, la souche de *Lactobacillus plantarum* indique déjà des biomasses assez importantes pour des températures inférieures à 40 °C, avec une biomasse de près de 10^8 ufc/ml. Pour des températures supérieures à 40°C, on observe un ralentissement de la croissance quelque soit le temps de fermentation (Fig. 10).

Pour des temps supérieurs à 24 heures, on se rend compte que quelque soit la température, plus le temps d'incubation augmente, plus la biomasse augmente jusqu'à 40°C, température à partir de laquelle on observe un net déclin des valeurs de la biomasse.

Ainsi les meilleures biomasses ont été obtenues pour toutes les souches à des températures globalement comprises entre 35°C et 45°C, et à un temps de fermentation variant de 36 heures à 48 heures (Fig. 10 et 12).

La souche de *Rhizopus oryzae* par contre indique globalement un retard dans la reprise d'activité quelque soit la température (Fig. 11). Ainsi, le démarrage effectif de la multiplication n'a lieu qu'à partir de la 48^{ème} heure.

On notera néanmoins une biomasse déjà importante à 30°C après 48 heures de culture avec 10¹²ufc/ml. Les meilleurs taux ont été néanmoins obtenus à 30°C après 60 heures de cultures avec 10¹³ufc/ml.

Des températures de 30°C pour 60 heures de culture, ont été donc des conditions optimales pour l'obtention des meilleures biomasses (10¹³ufc/ml) pour *Rhizopus oryzae*.

Les Tableaux 17 et 18 résument les comparaisons réalisées pour l'effet de la température sur la biomasse de *Lactobacillus plantarum* et *Rhizopus oryzae*.

Dans le cas de *Lactobacillus plantarum*, Il ressort de cette analyse qu'il n'y a pas de différence significative ($P < 0,05$) pour les effets de la température sur la biomasse entre 25 °C et 50 C ainsi qu'entre 35 °C et 40 °C (Tableau 17). L'influence de la température sur la biomasse de *Lactobacillus plantarum* ($P < 0,05$), nous indique que les meilleures biomasses sont obtenues pour les températures de 40°C, et dans une moindre mesure, 35°C et 45°C (Fig. 12).

Dans le cas de *Rhizopus oryzae*, on ne note pas de différence ($P < 0,05$) pour les effets de températures sur la biomasse pour les températures en paires suivantes : T25 - T30 (-1,1375), T25 - T35 (0,5875), T35 - T40 (1,79125), T35 - T45 (1,8125), T40 -

T45 (0,02125) et T30 - T35 (1,725) (Tableau 18). L'influence de la température sur la biomasse de *Rhizopus oryzae* ($P < 0,05$), nous indique que les meilleures biomasses sont obtenues pour les températures de 30°C, et dans une moindre mesure, 25°C (Fig. 13).

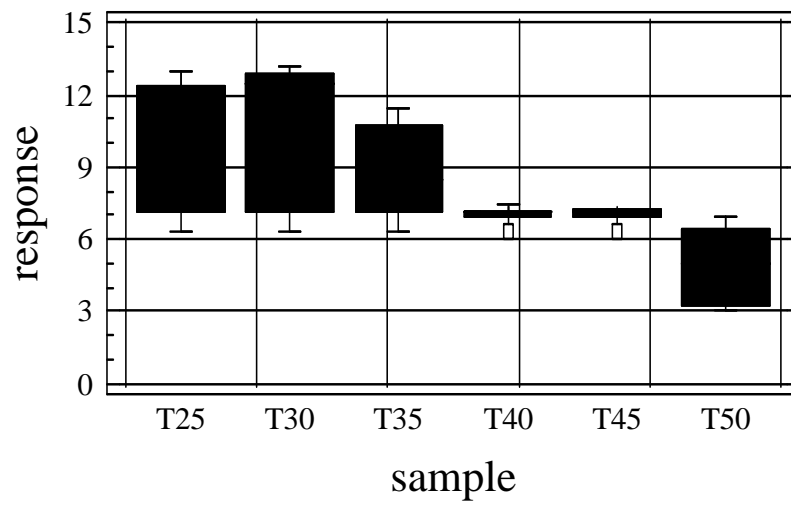


Fig. 12: « Box and Whisker » plot montrant l'influence de la température sur la biomasse, de *Lactobacillus plantarum* pour $P < 0,05$.

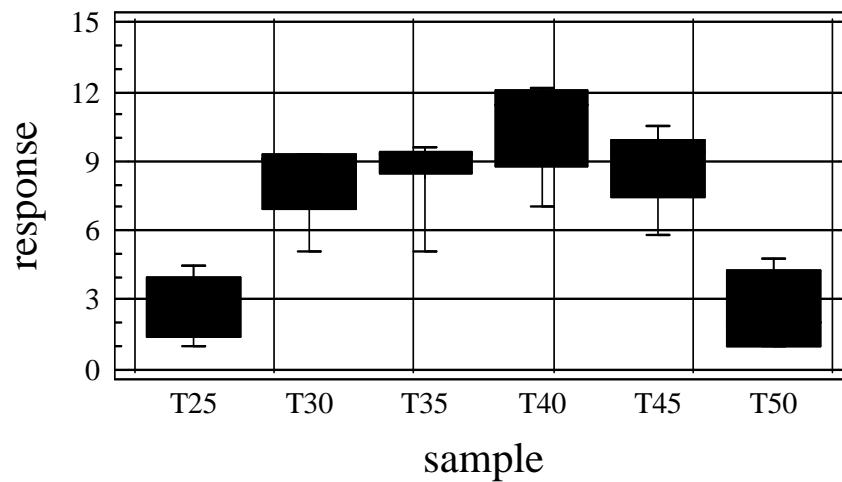


Fig. 13: « Box and Whisker » plot montrant l'influence de la température sur la biomasse, de *Rhizopus oryzae* pour $P < 0,05$

Tableau 17 : Multiple range test à 95% LSD, permettant de voir les écarts de réponses entre les différentes températures pour la souche de *Lactobacillus plantarum*

Contrast	Différence	+/- Limites
T25 - T30	*-5,3625	1,72925
T25 - T35	*-5,8625	1,72925
T25 - T40	*-7,725	1,72925
T25 - T45	*-5,975	1,72925
T25 - T50	0,2375	1,72925
T30 - T35	-0,5	1,72925
T30 - T40	*-2,3625	1,72925
T30 - T45	-0,6125	1,72925
T30 - T50	*5,6	1,72925
T35 - T40	*-1,8625	1,72925
T35 - T45	-0,1125	1,72925
T35 - T50	*6,1	1,72925
T40 - T45	*1,75	1,72925
T40 - T50	*7,9625	1,72925
T45 - T50	*6,2125	1,72925

* denotes a statistically significant différence.

Tableau 18 : Multiple range test à 95% LSD, permettant de voir les écarts de réponses entre les différentes températures pour la souche de *Rhizopus oryzae*

Contrast	Différence	+/- Limites
T25 - T30	-1,1375	2,02046
T25 - T35	0,5875	2,02046
T25 - T40	*2,37875	2,02046
T25 - T45	*2,4	2,02046
T25 - T50	*4,5375	2,02046
T30 - T35	1,725	2,02046
T30 - T40	*3,51625	2,02046
T30 - T45	*3,5375	2,02046
T30 - T50	*5,675	2,02046
T35 - T40	1,79125	2,02046
T35 - T45	1,8125	2,02046
T35 - T50	*3,95	2,02046
T40 - T45	0,02125	2,02046
T40 - T50	*2,15875	2,02046
T45 - T50	*2,1375	2,02046

* denotes a statistically significant difference.

III- 2- Influence du pH du milieu de culture sur la croissance et la dégradation de l'amidon.

L'étude de l'influence du pH du milieu de culture sur la multiplication des souches indique globalement que les pH varient en fonction des souches utilisées. Ainsi, entre 4,5 et 6,5, on a une meilleure biomasse pour la souche de *Lactobacillus plantarum* avec un optimum à pH 6. (Fig. 14).

Le suivi de la dégradation de l'amidon au cours du temps indique globalement pour toutes les deux souches que la bio transformation de l'amidon est liée à la croissance microbienne (Fig. 14 et 15). Les intervalles de pH favorisant cette biotransformation sont identiques à ceux de la croissance c'est à dire entre 4,5 et 6,5, pour la souche de *Lactobacillus plantarum* avec un optimum à pH 6 (Fig. 14) et pH 5,5 pour la souche de *Rhizopus oryzae* (Fig. 15).

Le meilleur pH de production de biomasses et de biotransformation de l'amidon en sucres fermentescibles est pH 6 pour *Lactobacillus plantarum*

L'influence du pH sur la croissance de *Rhizopus oryzae* isolés du manioc et la biotransformation de l'amidon en sucres fermentescibles (Fig. 15), indique une cinétique de production de sucres fermentescibles, associée à la croissance microbienne, avec un pic d'activité à pH 5.

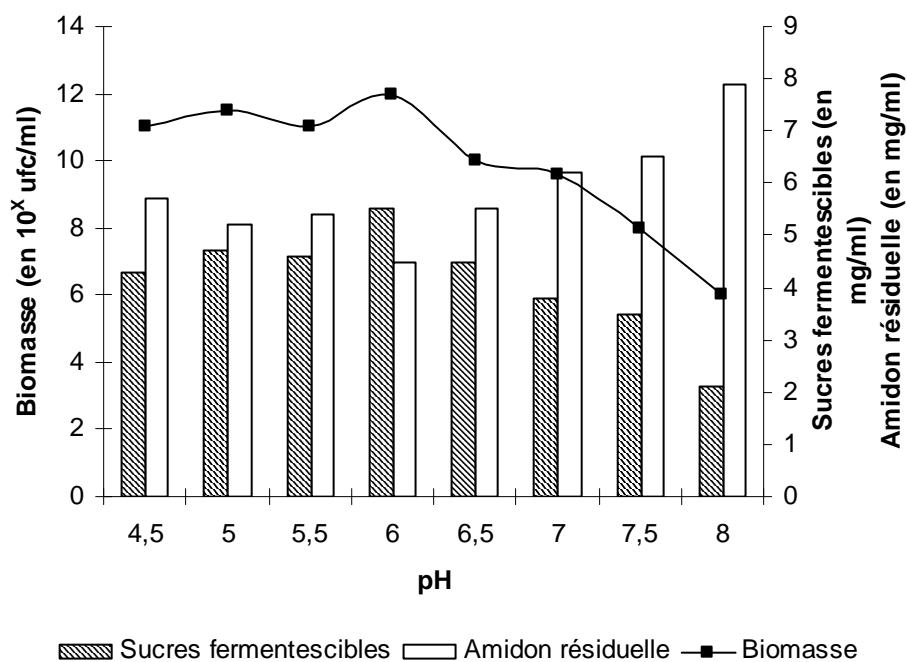


Fig. 14 : Influence du pH sur la croissance de *Lactobacillus plantarum*, et la dégradation de l'amidon en sucres fermentescibles.

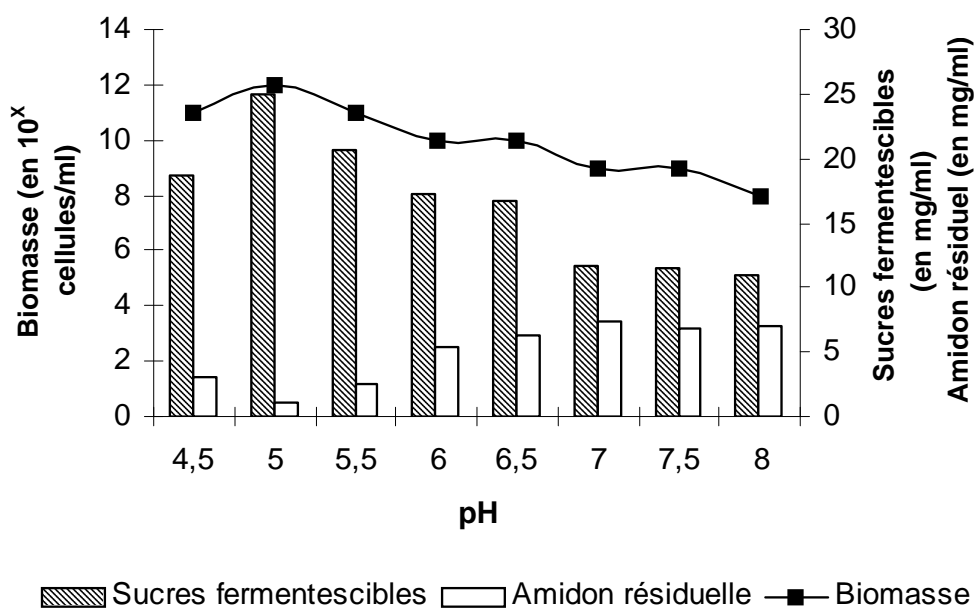


Fig. 15 : Influence du pH sur la croissance de *Rhizopus oryzae*, et la dégradation de l'amidon en sucres fermentescibles.

Tableau 19 : Analyse de régression multiple pour l'effet du pH sur la biotransformation de l'amidon du manioc par *Lactobacillus plantarum*

Parameter	Estimate	Error	Statistic	P-Value
pH	3,79915	68,8883	0,0551495	0,9587
Amidon résiduel	0,866308	6,84016	0,12665	0,9053
Biomasse	1,32239	0,426451	-3,10091	0,0362
Sucres fermentescibles	2,53266	6,62461	0,382311	0,7217

Analyse des variances

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	9,18295	3	3,06098	9,30	0,0282
Residual	1,31705	4	0,329263		
Total (Corr.)	10,5	7			

R-squared = 87,4567 percent

R-squared (adjusted for df.) = 78,0491 percent

Standard Error of Est. = 0,573814

Mean absolute error = 0,285508

Durbin-Watson statistic = 2,46917

Tableau 20 : Analyse de régression multiple pour l'effet du pH sur la biotransformation de l'amidon du manioc par *Rhizopus oryzae*

Parameter	Estimate	Error	Statistic	P-Value
pH	15,7142	5,41113	2,90404	0,0439
Amidon résiduel	0,115274	0,262345	0,439398	0,6831
Biomasse	-1,27032	0,611758	-2,0765	0,1064
Sucres fermentescibles	0,161458	0,177273	0,910787	0,4139

Analyse de variances

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	9,41296	3	3,13765	11,55	0,0194
Residual	1,08704	4	0,271759		
Total (Corr.)	10,5	7			

R-squared = 89,6473 percent

R-squared (adjusted for df.) = 81,8827 percent

Standard Error of Est. = 0,521305

Mean absolute error = 0,297598

Durbin-Watson statistic = 2,31326

Les Tableaux 19 et 20 résument les résultats issus de l'analyse de régression linéaire multiple décrivant les interactions entre le pH l'amidon résiduel, la biomasse et les sucres fermentescibles. Les équations de régressions obtenues sont :

Pour la souche de *Lactobacillus plantarum*,

$$\text{pH} = 3,79915 + 0,866308 * \text{Amidon résiduel} - 1,32239 * \text{Biomasse} + 2,53266 * \text{Sucres fermentescibles}.$$

Pour la souche de *Rhizopus oryzae*,

$$\text{pH} = 15,7142 + 0,115274 * \text{Amidon résiduel} - 1,27032 * \text{Biomasse} + 0,161458 * \text{Sucres fermentescibles}$$

L'on constatera que la valeur de P dans l'analyse des variances (Tableau 19) est inférieure à 0,05, il existe donc une interaction statistiquement significative entre les variables au seuil de 95% aussi bien pour les deux microorganismes. La valeur de R^2 indique que le model de régression exprime 87,4567% dans la variabilité du pH dans le cas de *Lactobacillus plantarum* et 89,6473% pour le *Rhizopus oryzae*. La valeur de R^2 ajustée qui est la mieux indiquée pour les comparaisons des modèles avec différents, nombres de variables indépendantes est par contre de 78,0491% dans le cas de *Lactobacillus plantarum* et 81,8827% pour *Rhizopus oryzae*.

III- 3- Influence du pH sur la dégradation des composés cyanés par les microorganismes sélectionnés

On notera qu'aux environs de pH 5,5, les composés cyanés (l'acide cyanhydrique, la linamarine et les cyanohydrines) sont fortement éliminés (Fig. 16). Pour des pH inférieurs à 5,5 on note une évolution de la linamarine en cyanohydrine mais la dégradation de la cyanohydrine en acide cyanhydrique semble bloquée. Aux pH supérieurs à 5,5 les glucosides sont globalement peu affectés (Fig. 16).

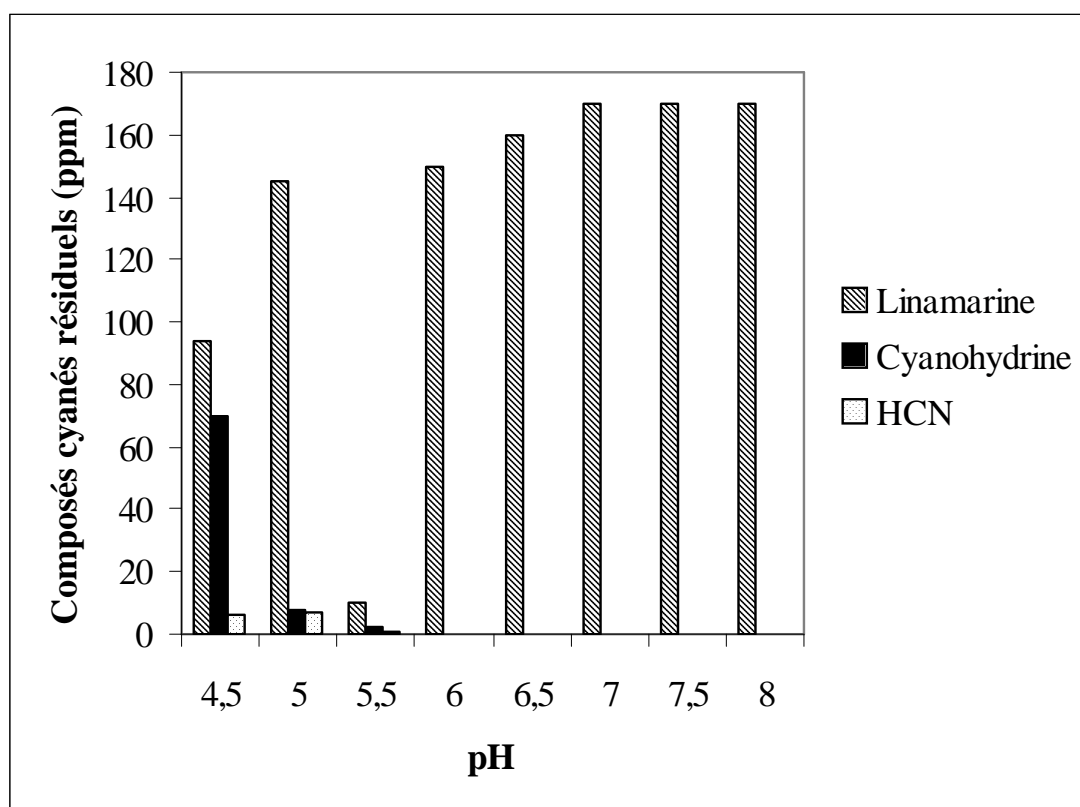


Fig. 16 : Effet du pH sur la dégradation des composés cyanés.

L'influence du pH sur la dégradation des composés cyanés indique globalement que les glucosides totaux sont peu affectés par le pH. En effet, l'analyse de régression

simple effectuée indique que $P = 0,1176$; $r = 0,597763$ et $R^2 = 35,7321 \%$. Pour une équation de régression de:

$$\text{Glucosides totaux résiduels} = -37,0595 + 27,3095 \cdot \text{pH}$$

Étant donné que la valeur P obtenue pour l'analyse de variable est supérieure à 0.10, ($0,1176 > 0,10$) le pH n'a aucune influence statistiquement significative sur les Glucosides totaux résiduelles pour un intervalle de confiance supérieure ou égal à 90%.

Les cyanohydrines par contre indiquent que $P = 0,0871$, $r = -0,64054$, et $R^2 = 41,0292\%$

L'équation du model résultant décrivant la relation entre les cyanohydrines et le pH est:

$$\text{Cyanohydrines} = 89,7619 - 12,7619 \cdot \text{pH}$$

Nous noterons à cet effet que la valeur de P (0,0871) obtenue au cours de l'analyse des variances est inférieure à 0,10 ceci implique qu'il existe une relation statistiquement significative entre le pH et les cyanohydrines pour un intervalle de confiance de 90%. La dégradation de la cyanohydrine serait donc tributaire de l'évolution du pH.

III- 4- Influence de la température sur la production des enzymes par les microorganismes sélectionnés

L'influence de la température sur la production des enzymes indique globalement que les températures comprises entre 30°C et 40°C ont été meilleures (Fig. 17). Ainsi, la souche de *Lactobacillus plantarum* a une meilleure activité de

production de linamarase, à 30°C avec 1095 ± 86 UE/ml, d'amylases (16800 ± 186 UE/ml) et de pectinases ($0,5 \pm 0,02$ UE/ml). La souche de *Rhizopus oryzae* par contre présente les meilleures performances de production des enzymes à la même température (amylases 20000 ± 963 UE/ml, et $2,2 \pm 0,05$ $\mu\text{mol COO}^-/\text{mn}/\text{mg}$ de pectinases, 10 ± 86 $\mu\text{mol CN}^-/\text{mn}$ de linamarase) (Fig. 17).

On notera qu'à 25°C et à 50°C il n'y a aucune ou presque pas d'activité enzymatique quelque soit le microorganisme et l'enzyme incriminés (Fig. 17).

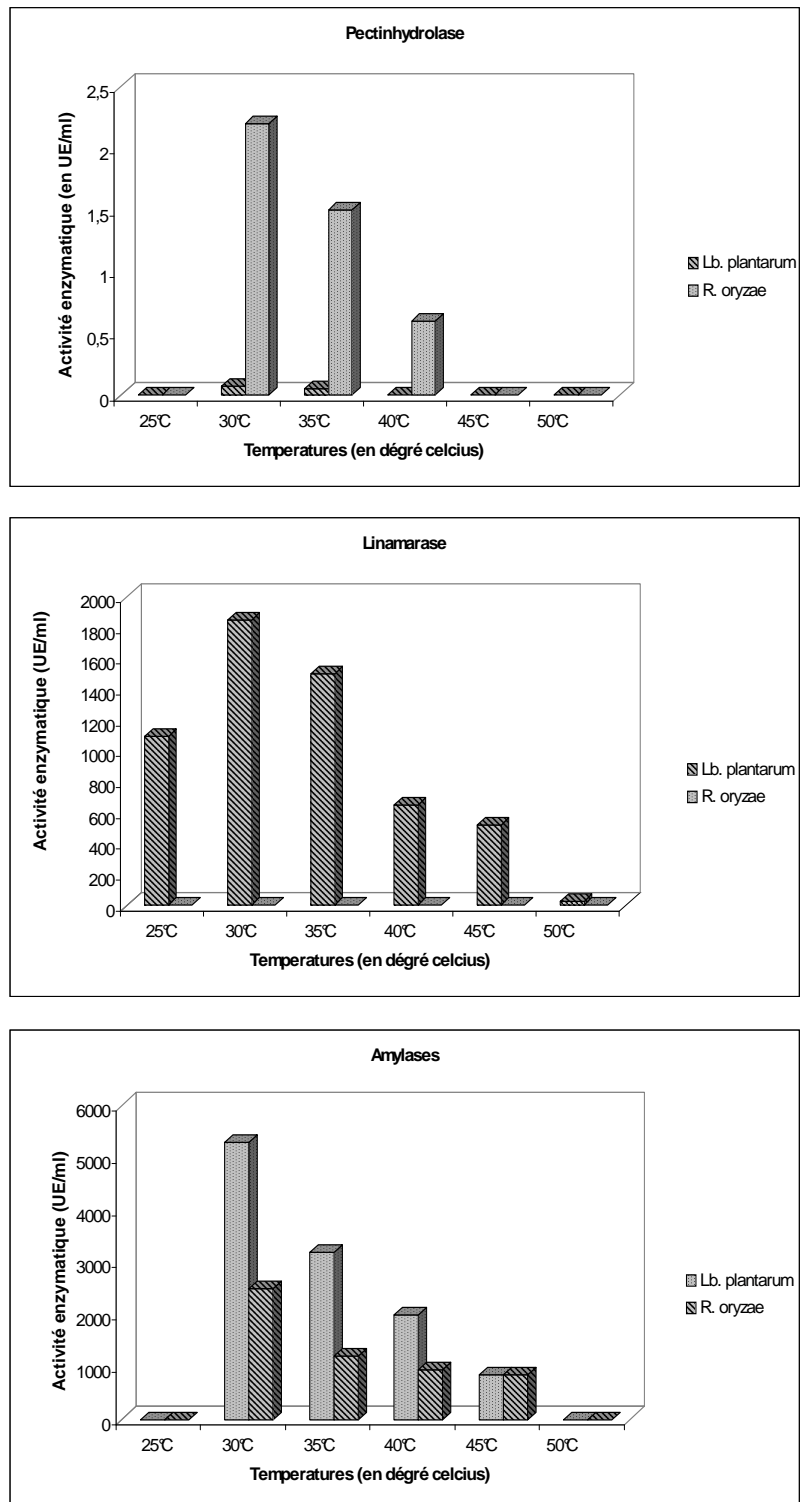


Fig. 17 : Influence de la température sur la production des enzymes

On notera de prime à bord que la souche de *Rhizopus oryzae* présente une meilleure aptitude de production de l' α -amylase avec 20000 ± 963 UE/ml après 48 heures de culture, pour 16800 ± 186 UE/ml dans le cas de *Lactobacillus plantarum*. *Rhizopus oryzae*, présente en outre une meilleure aptitude de dégradation de l'amidon de manioc avec des biomasses globalement assez élevées de $6,4 (\pm 2,9) 10^8$ ufc/ml contre $5,6 (\pm 0,2) 10^{12}$ ufc/ml pour *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus plantarum* présente la meilleure aptitude de synthèse de linamarase avec après 48 heures seulement des taux de synthèses de 1095 ± 86 $\mu\text{mol CN}^-/\text{mn}$ contre $10 \pm 0,66$ $\mu\text{mol CN}^-/\text{mn}$.

VI- Discussion

L'influence des facteurs externes sur la croissance et l'activité des souches au cours du rouissage du manioc étudié ici indique globalement que l'activité des microorganismes est fortement influencée par le pH et la température. On remarquera que les pH 5,5 et 6 sont propices à la dégradation des composés cyanés alors qu'en dessous ou au-dessus de cet intervalle, l'activité est fortement réduite. De même les meilleures températures d'activité semblent être comprises entre 35°C et 40°C. Ces observations sont confortées par le fait que la linamarase a son optimum d'activité aux pH compris entre 5.5 et 6 et à une température de 37°C ; elle est relativement stable jusqu'à 72°C (Butler, 1965; Nartey 1968). Cooke, Blake, Battershill, (1978), indiquent par ailleurs que la dégradation des glucosides cyanogénétiques au cours des processus naturels s'effectue en deux phases : La première serait une hydrolyse de la linamarine et de la lautostraline, sous l'action d'une enzyme endogène, la linamarase qui aboutit à la formation d'une cyanohydrine toxique, et à la libération d'un glucose; la deuxième étape est la dissociation de la cyanohydrine en acide cyanhydrique et cétone. Cette dissociation est surtout chimique au cours du rouissage naturel (Coon 1969). L'étude de la stabilité de la cyanohydrine à différents pH (Cooke, Blake et Battershill 1978) montre qu'elle est relativement stable en milieu acide, l'équilibre entre l'acide cyanhydrique et la cyanohydrine s'instaurant pour un pH voisin de 5,5. Cette observation pourrait expliquer le fait que nous n'ayons pas eu de dégradation significative au cours du rouissage par la souche de *Lactobacillus plantarum* à activité linamarase, effectué au cours du chapitre précédent. En effet le pH obtenu après 24 heures était déjà en dessous de 5. La dégradation se serait donc bloquée au niveau de

la cyanohydrine. Nous noterons à cet effet que les résultats obtenus au cours de ces essais indiquent une accumulation de la cyanohydrine pour des pH inférieurs à 5,5.

Okafor *et al.*, (1984) indique que le ramollissement du manioc lors du rouissage se produit par dissociation des fibres de cellulose de leur ciment pectique due à l'action d'enzymes telles que les hydrolases et les lyases sur les liaisons osidiques des pectines. Les pectinases étudiées ici sont surtout la pectine hydrolase et la polygalacturonase. L'effet des facteurs externes notamment le pH et la température sur l'activité pectinolytique de ces microorganismes étudiés, indique des interactions faibles ($r_{pH} < 0,6$ et $r_{température} < 0,4$) ce qui laisse suggérer que ces deux facteurs influencent peu l'activité des enzymes au cours du rouissage. Okafor *et al.*, (1984) indiquent à cet effet que le ramollissement qui débute le deuxième jour au cours du rouissage naturel du manioc se passe souvent dans des conditions acides et anoxiques et ne sont pas sujettes aux fluctuations importantes de températures. Ceci indique que les phénomènes, à l'origine de ce ramollissement, sont acido-tolérants et facultatives aux variations de températures.

VII- Conclusion

L'objectif de cette dernière partie était de dégager l'influence des facteurs température et pH sur l'activité des souches. Il en ressort à quelques exceptions près que les facteurs températures, et pH du milieu influencent énormément l'activité des souches. On notera ainsi que la température optimale de croissance de *Lactobacillus plantarum* est de $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$ et le pH optimal de 6. *Rhizopus oryzae* indique une température optimale de croissance à $30 \pm 7^{\circ}\text{C}$ et un pH optimal de 5. L'étude de

l'activité des enzymes microbiens indique un optimum d'activité à $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ et un pH de 5 ± 2 quelque soient l'enzyme et la souche incriminés. Il faut noter aussi le fait que seuls un pH de 5,5 assure la dégradation complète des composés cyanés. Ces paramètres devraient être mis à contribution aussi bien pour la production des cellules que pour la conduite des fermentations afin de bénéficier au mieux de l'action de ses souches. Il pourrait être intéressant de réaliser un ferment mixte des deux souches au moins (une bactérie lactique et une moisissure) afin, de bénéficier des avantages liés à chacune des deux souches sous réserve d'éventuelles interactions négatives.

Chapitre 5

PRODUCTION ET SECHAGE DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ET *RHIZOPUS ORYZAE* SUR QUELQUES SUPPORTS LOCAUX

I- INTRODUCTION.

La réalisation d'une fermentation de type artisanale à l'échelle semi-industrielle comprend plusieurs phases, dont la première et sûrement la plus importante a été l'identification des microorganismes responsables de la transformation du produit, (Roblain *et al.*, 1995). Cet aspect du travail a largement été abordé au cours des chapitres précédents. Cette étape a été importante mais pas suffisante car l'inoculation des germes sélectionnés impose une biomasse initiale pure et en quantité (Ampe *et al.*, 1994). La multiplication des germes sélectionnés et testés en culture pure et en culture mixte devient donc une nécessité.

La production de ces microorganismes en grande quantité nécessitera la mise en œuvre d'un fermenteur. L'utilisation d'un fermenteur induira une maîtrise parfaite des paramètres de croissance des germes à y développer, des interactions multiples et complexes existants entre les conditions de culture, les rendements en biomasse, et la potentialité des microorganismes à coloniser le substrat (Agin et Blau, 1982).

Si les étapes de sélection et de production des germes sont importantes, pour une exploitation semi-industrielle ou industrielle, la possibilité de stocker la biomasse doit bien souvent être envisagée. Or les cultures successives, pratiquées selon les méthodes de la bactériologie classique, entraînent presque toujours des variations plus ou moins importantes des caractères du génotype (perte du pouvoir producteur,

modification des caractères morphologiques, apparition ou disparition d'organites) (Roberts, 1985). Cette propriété particulière qu'ont les microorganismes de subir, au cours des repiquages, de telles transformations ou variations entraîne, du point de vu industriel, un énorme inconvénient (Harrigan et Cance, 1976). Roblain *et al.*, (1995) indiquent à cet effet que le séchage des microorganismes sur un support adéquats, permet de minimiser ces contraintes ; c'est la raison pour laquelle cette méthode classique de transferts répétés est à proscrire pour le starter. Il faudra alors rechercher une méthode de conservation convenable des souches permettant la stabilisation des propriétés des microorganismes avec comme préoccupation constante le maintien de la vigueur de ces souches. La méthode de conditionnement et de conservation choisie ici est le séchage sur supports locaux. Ceci nécessitera d'étudier les interactions multiples et complexes existants entre les aptitudes à supporter les traitements de conditionnement, la rapidité dans la reprise d'activité, la potentialité des microorganismes à coloniser voir adopter le nouveau substrat.

Les objectifs visés par cette partie seront principalement la détermination de quelques paramètres optimaux de production et de stockage des souches du ferment.

Nous étudierons l'incidence du milieu de culture, sur la production de biomasse en bioréacteur, et l'influence du séchage sur la survie d'une population de *Lactobacillus plantarum* et *Rhizopus oryzae* en rapport avec la nature du support, et les conditions physico-chimiques de séchage.

II- MATERIEL ET METHODES.

1. Préparation des inoculums.

L'inoculum de *Lactobacillus plantarum* précédemment isolé et conservé sur gélose inclinée a été pré cultivé sur bouillon MRS, dans des erlens de 500ml. Le pH a été ajusté à 6,9 à l'aide d'un tampon citrate phosphate 0,1M. L'ensemble a été incubé pendant 24 heures à 40°C.

La souche de *Rhizopus oryzae* a été repiquée sur milieu gélosé PDA en boîte de pétrie de 800 mm, incubée à 30°C pendant 24 à 48 heures. Les spores ont été récupérées par immersion, et lavage à l'eau distillée stérile, de la surface de la gélose.

2. Préparation des substrats

2-1 La source de carbone

Les substrats utilisés pour les milieux de cultures ont été :

Le substrat CTM (Chemithermomechanical Cassava Roots) préparé à partir du son de manioc par la méthode de Law *et al.*, (1983). La farine de son de manioc finement broyée et tamisée est majoritairement composée d'hémicelluloses et de lignine (Law *et al.*, 1983). La composition de ce substrat est de (% matière sèche): amidon 35-46; cellulose et hémicelluloses, 10 à 15; et lignine, 5 à 8.

Le substrat WS (Wheat Straw ou son de maïs) préparé à base de son de maïs par la méthode de Harrigan et Mc Cance, (1976). La composition de substrat serait de (en % de matière sèche) : amidon, 40; cellulose et hémicelluloses, 29,2; lignine, 13,6; protéine, 3,6 ; et matériels résiduels 13,6.

Les substrats ainsi préparés seraient composés de 70% de sucres (amidon et

cellulose en majorité) nécessaires et suffisants pour induire l'aptitude à la production des cellulases, de la linamarase et de l' α -amylase (Mandel et Werber, 1969).

2-2- Pré-traitement des substrats.

Les substrats en poudre précédemment préparés (140 g) ont été introduits dans des Erlenmeyer de 7l. Chaque substrat a été mélangé à 476 ml de NaOH 0,1N. Le mélange est effectué à 4% v/v. Le mélange a été stérilisé à 121°C (pendant 30 mn pour le son de maïs et 1 heure pour le son de manioc).

2-3- Nutriments

Le milieu nutritif décrit par Mandel et Weber (1969) pour l'induction de la production des enzymes pectinolytiques a été utilisé sous forme de concentré. Les besoins en nutriments ont été déterminés en rapport avec la quantité de substrats utilisée pour chaque essai. Le milieu nutritif après dissolution dans 1000ml de substrat précédent contenait: KH_2PO_4 , 784g; $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 548,8g; Urée 117,9g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 117,6g; CoCl_2 , 117,6g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,960g; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,61152g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5488g; CaCl_2 0,784g; et l'extrait de levure, 196g. L'ensemble a été stérilisé à 121°C pendant 20 min, avant mélange avec le substrat.

3. Conduite de la fermentation

Les pré cultures précédemment préparées servent d'inoculum pour un micro-fermenteur de laboratoire, de 7l de contenance, de marque Multigen, pour *Lactobacillus*

plantarum, tandis que la moisissure *Rhizopus oryzae* a été cultivée sur milieu gélosé dans des Boîtes de 52 X 100

Les milieux MRS (de Man Rogosa et Sharp, 1960) en bouillon pour *Lactobacillus plantarum*, et PDA gélosé pour *Rhizopus oryzae*, ont été utilisées comme références.

La culture de *Lactobacillus plantarum* a été réalisée sous agitation de 50, 100, 150 et 200rpm

Le pH a été ajusté à pH 5,5 (optimum pour *Lactobacillus plantarum*) et 4,5 (optimum pour *Rhizopus oryzae*) par addition aux milieux de culture stériles, de NaOH 0,1N ou d'une solution d'acide chlorhydrique (HCL 0,1N) selon que l'on désire rendre le milieu basique ou acide.

L'inoculation a été réalisée à 10^3 ufc/ml pour les souches de *Lactobacilles plantarum* alors que, *Rhizopus oryzae* l'a été à 10^2 spores/ml.

La durée de la fermentation a été de 48 heures à 40°C pour *Lactobacillus plantarum* et 72 heures à 30°C pour *Rhizopus oryzae*.

4. Préparation des concentrées

Les cellules de *Lactobacillus plantarum* ont été récupérées après 48 heures par centrifugation à 2500rpm pendant 10 minutes. Le culot compact a été remis en suspension dans de l'eau physiologique stérile à 30°C puis, centrifugé à nouveau à 2500rpm pendant 10 minutes. Le culot compact repris une fois encore dans de l'eau physiologique, a été conservée à 4°C pour la suite du travail, la durée de conservation ne dépassant pas 24 heures avant utilisation (Fig. 18).

Les spores de *Rhizopus oryzae* ont été récupérées par immersion, et lavage à l'eau distillée stérile, de la surface de la gélose puis concentration par filtration à l'aide d'un appareil de filtration sous vide de type Sartorius muni d'une membrane de filtration de 0,5 μ . Le culot de filtration pâteux a été récupéré et conservé au frais dans des boîtes hermétiquement fermées pour la suite du travail.

5- Préparation du support

Cinq types de supports ont été préparés par les méthodes décrites par, Mugnier et Jung (1984) : il s'agit du gel de silice (Silica gel Laboratoires Biomerieux, France), du talc (Etablissements François Saint-Maur-Des-Fosses, France), de la gomme de Xanthane (Rhodopol 23; Rhone Poulenc), de l'amidon de manioc (farine de manioc) et de l'argile (Kalaba). Environ 2 g de support anhydre ont été introduits dans 50 ml d'eau distillée. L'ensemble a été porté à 70-80°C, pendant 20 à 30 minutes sous agitation constante, puis refroidi à environ 30-40°C.

6- Ajout de l'agent de protection et du support

Trois agents de protection ont été testés : il s'agit du saccharose, du glycérol, et du mannitol. Des solutions à 20 g/l ont été préparées et stérilisées. Les microorganismes précédemment produits ont été alors ajoutés à raison de 10⁹ufc/g de support pour la souche de *Lactobacillus plantarum* et 10⁴spores/g de support de *Rhizopus oryzae*, puis vigoureusement mélangés. Le mélange agent de protection et microorganisme d'aspect liquide, a été alors ajouté aux différents supports de manière à avoir des mélanges d'aspect pâteux (Fig. 18).

7- Ajustement de l'activité de l'eau (a_w) par équilibrage à l'aide des solutions saturées (Multon et Bizot, 1976 ; Henderson et Pixton, 1981)

De la poudre sèche des inoculums (10g) a été placée dans un incubateur fermé dans laquelle l'activité de l'eau (a_w) a été contrôlée par des solutions saturées de sels. Ces solutions donnent des activités de l'eau qui varient très peu avec la température (25 à 27°C). Les valeurs de l'activité de l'eau ont été de 0,1 pour le NaOH ; 0,32 pour du $MgCl_2$; 0,43 pour du $K_2CO_3 \cdot 2H_2O$; 0,52 pour $Mg(NO_3)_2$; 0,68 pour du $CuCl_2$; 0,75 pour le NaCl, et 0,84 pour KCl (Mugnier et Jung, 1985). Les expériences avec des valeurs plus élevées des a_w n'ont pas pu être validés à cause des contaminations spontanées.

8- Séchage

Le séchage a été réalisé, selon les méthodes décrites par Roblain *et al.* (1995). Le principe du séchage utilisé ici a consisté en une mise en suspension par un flux d'air de particules réparties sur toute la surface du lit. L'air a été fourni par un compresseur, les températures ont été mesurées par des thermocouples cuivre-constantin connectés à un système d'acquisition de données. Les différentes prises de températures se situent à l'entrée d'air, à la sortie d'air et en surface de l'échantillon à sécher. Les échantillons ont été séchés à 30°C, 35°C, 40°C, 45°C et 50°C.

9- Dispositif expérimental

Un dispositif factoriel 5X4X5X4 a été utilisé soit 5 types de supports, 4 agents de protection, 5 pourcentages de matière sèche en début de séchage, et 4 températures de séchage.

10- Méthodes analytiques

Mesure des matières sèches

Le suivi de la matière sèche a été effectué sur des prélèvements de 10 g, toutes les 12 heures, pesés puis portés à 105°C pendant 24 heures avant d'être à nouveau pesés.

Suivi de la Biomasse

Numération de *Lactobacillus plantarum*

Les bactéries *Lactobacillus plantarum* ont été dénombrées sur gélose MRS sur 1 millilitre du prélèvement pour les essais de production et 1g de poudre sèche pour les essais de séchage, ensemencé dans la masse et incubé à 37°C, pendant 48 heures. La numération a été alors réalisée par pointage à l'aide d'un "coulters" électronique.

Dénombrement de *Rhizopus oryzae*

Un gramme de milieu en cours de fermentation pour les essais de production de biomasse, et 1g de poudre du starter séché, ont été prélevés toutes les 12 heures et des dilutions appropriées ont été effectuées dans de l'eau peptonée. Des ensemencements en surface de la gélose PDA à l'actidionne, ont été réalisés. Après 48 à 72 heures

d'incubation à 30 °C. Un dénombrement par pointage direct des colonies caractéristiques de moisissures a été réalisé.

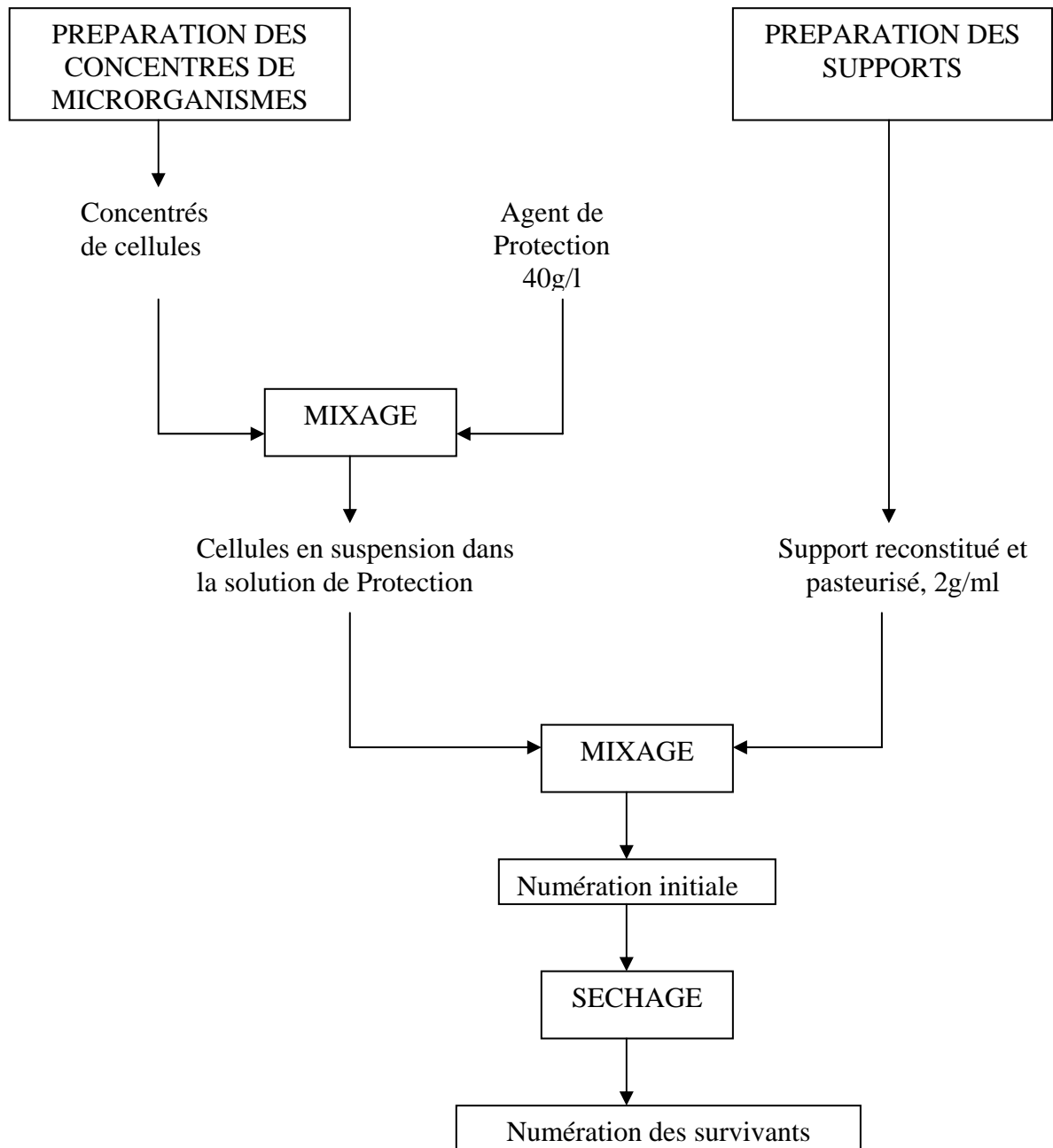


Fig. 18 : Préparation du ferment

III -RESULTATS ET DISCUSSIONS.

1- Influence du milieu de culture sur la croissance des microorganismes

Les microorganismes présentent des cinétiques classiques de croissance microbienne aussi bien sur milieux CBM à base d'amidon de manioc que sur milieux synthétiques CTM (au son de manioc), WS (au son de maïs), ou sur les milieux conventionnels (Bouillon MRS pour *Lactobacillus plantarum*, et PDA pour *Rhizopus oryzae*) en batch. On note ainsi que les phases de latence qui correspondent à l'adaptation du microorganisme aux substrats, varient en fonction des milieux. Mais ici les milieux MRS, PDA et CTM (au son de manioc) semblent mieux être colonisés par les microorganismes avec des phases d'adaptation presque inexistantes, par rapport aux milieux WS (au son de maïs) et CBM à l'amidon de manioc qui présentent des phases d'adaptation respectives de 12 et 24 heures pour *Lactobacillus plantarum* et 36 heures pour *Rhizopus oryzae* (Fig. 19).

L'analyse des variances (Tableau 21) indique qu'il n'existe pas de différence entre les moyennes de biomasses obtenues sur les différents milieux pour les deux souches. Étant donné la disponibilité et le coût des autres milieux, il conviendra de porter le choix sur le milieu à base d'amidon de manioc pour la production des souches de *Lactobacillus plantarum*

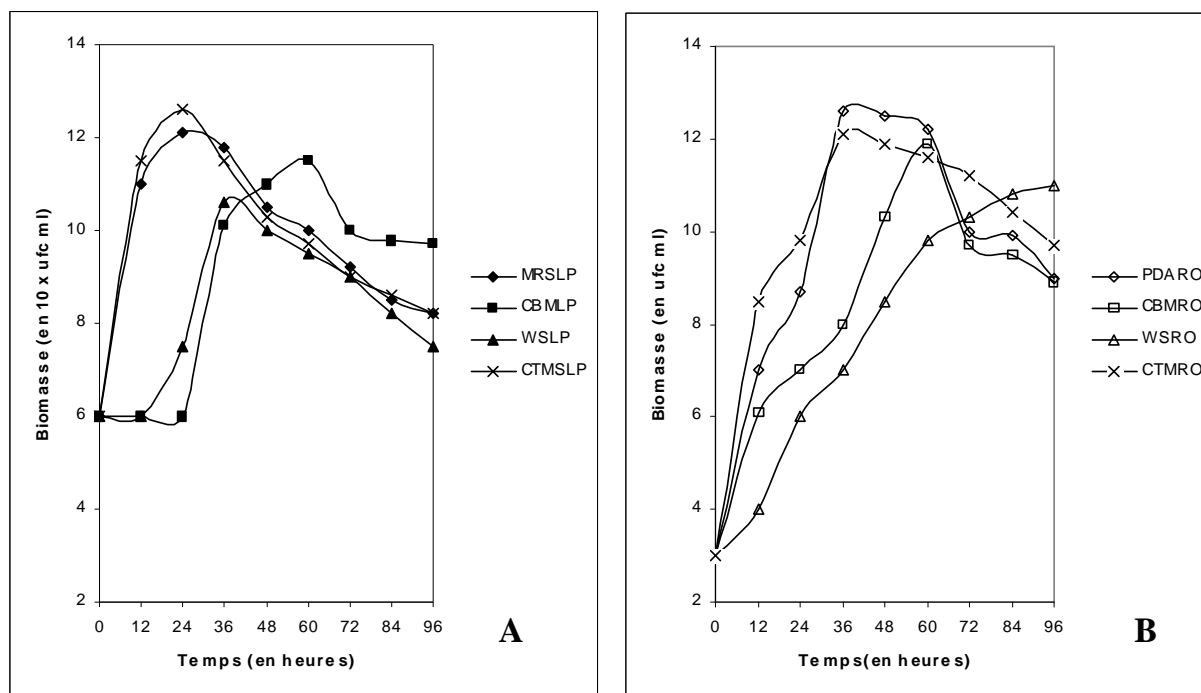


Fig. 19 : Evolution de la biomasse de *Lactobacillus plantarum* (A) et *Rhizopus oryzae* (B) sur quelques substrats en bioréacteur.

Conditions opératoires :

Lactobacillus plantarum : Température 40°C pH 5,5 ; agitation de 200tr/mn

Rhizopus oryzae : Température 30°C pH 4,5 ; sans agitation

Légende :

MRS: milieu conventionnel de Man Rogosa et Sharp pour la culture des *Lactobacillus*

PDA: milieu Potatoes Dextrose Agar pour la culture et l'isolement des Moisissures

CSM: milieu à base d'amidon de manioc (Okafor,1984)

WS: milieu Wheat Straw de Harrigan et Mc Cance, (1976) au son de maïs

CTM : milieu Chemithermomechanical Cassava Roots de Law *et al.*, (1983).

LP : *Lactobacillus plantarum*

RO : *Rhizopus oryzae*

Tableau 21 : Analyse de variances relatives aux biomasses obtenues sur divers milieux

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	26,7084	3	8,90281	2,27	0,1019
Within groups	109,669	28	3,91674		
Total (Corr.)	136,377	31			

Les essais de production de cellules réalisés ici indiquent globalement pris que le meilleur milieu de multiplication des cellules est le milieu CTM au son de manioc avec des biomasses finales de $6,4 \cdot 10^{12}$ ufc/ml pour *Lactobacillus plantarum* et $9,3 \cdot 10^{12}$ ufc/ml pour *Rhizopus oryzae*. Malgré les temps d'adaptation globalement longs, pour ce milieu, il est paradoxal qu'ils aient de meilleurs rendements en biomasse comparativement aux milieux conventionnels MRS et PDA. En effet, ces deux milieux de cultures ont comme source de carbone du glucose qui devrait être plus vite et facile à métaboliser que l'amidon et la cellulose contenus dans le milieu CTM (De Man Rogosa et Sharp, (1960). Briggs (1983) indique à cet effet que les substrats glucosés sont mieux indiqués pour les isolements notamment dans les milieux sélectifs, ou alors employés pour la réalisation des subcultures. Brisou, (1971) indique par ailleurs que les meilleurs milieux pour la production des cellules sont les substrats amidonnés et les substrats cellulosiques. Il faut noter par ailleurs que le milieu CTM est en majorité composé d'amidon, et de cellulose. L'effet de changement de substrat observé pour les milieux conventionnels caractérisé par une phase de latence longue comparativement au milieu CTM. En fait le milieu CTM (Law *et al.*,1983) a une composition assez

proche du milieu d'isolement des souches (cossettes de manioc). Ceci pourrait expliquer les bons rendements en biomasses obtenues au cours de nos expérimentations. Ce substrat serait indiqué pour la multiplication des souches que nous avons isolées.

2- Effet de l'agent protecteur et du support sur la survie des microorganismes du Ferment au cours du séchage.

La Figure 20 indique les différents taux de survie des microorganismes du ferment au cours du séchage, selon l'agent de protection utilisé. On se rend compte qu'il n'existe pas de différence significative ($P < 0,05$) pour l'effet des agents glycérols, mannitol et saccharose sur la survie de *Lactobacillus plantarum*, mais comparativement au séchage sans agent, ces trois agents ont un effet significatif (Fig. 20). Pour l'effet des agents sur *Rhizopus oryzae*, Il apparaît nettement une différence significative ($P < 0,05$) entre les essais de protection utilisés avec un meilleur taux de survie obtenu avec le glycérol comme agent de protection (Fig. 20).

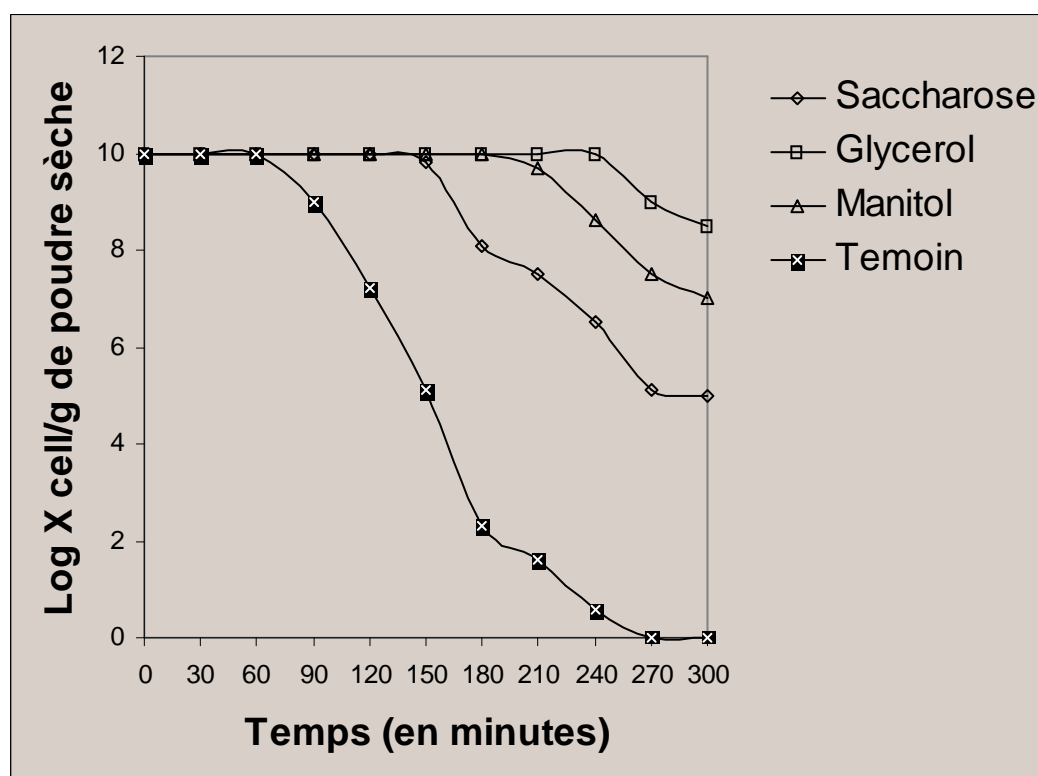
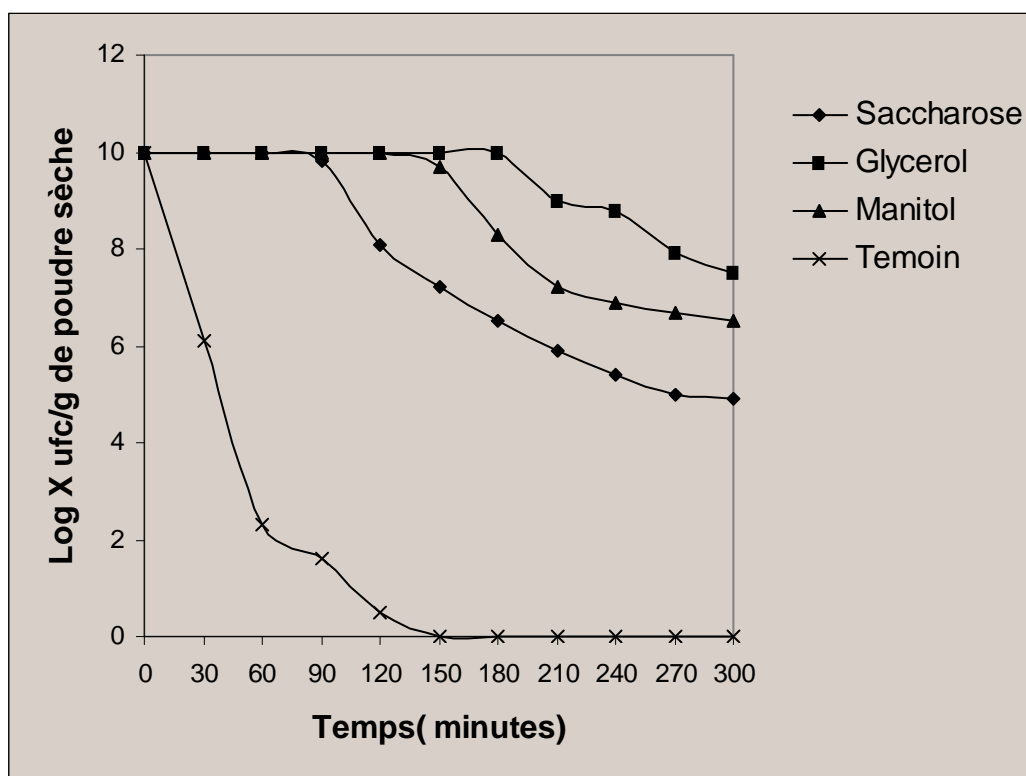


Fig. 20 : Effet des agents de protection sur la survie des souches de *Lactobacillus plantarum* (A) et de *Rhizopus oryzae* (B) au cours du séchage

Le taux de mortalité des microorganismes du ferment sans agent de protection sont plus rapides pour *Lactobacillus plantarum* comparativement aux taux de survies avec agents de protection de même que pour *Rhizopus oryzae* en présence des agents de protections, les taux de détérioration ont été moins rapides vis à vis de l'essai sans agent de protection (Fig. 20). La mortalité commence pour le Saccharose, le mannitol et le glycérol respectivement après 60, 120 et 180 min après le début du séchage dans le cas de *Lactobacillus plantarum* et 150, 210 et 270 minutes, après le début du séchage dans le cas de *Rhizopus oryzae* alors que sans agent de protection on note un début de destruction cellulaire dès la première heure pour *Lactobacillus plantarum* et dès la 60^{ème} heure pour *Rhizopus oryzae* (Fig. 20). Au cours du séchage, un grand nombre de microorganismes sont tués. La proportion de survivants qui varie souvent entre 5 et 30% du chiffre initial, serait dépendante du fluide protecteur utilisé (Roblain *et al.*, 1995).

En effet, afin d'augmenter les chances de survie des germes au cours de l'opération de séchage, on a coutume d'ajouter à la suspension, des colloïdes protecteurs tels que le lait, le sérum, le blanc d'œuf, de la peptone, de la mucine ou des sucres (Buttiaux, Beerens et Taquet, 1974). Cependant, cette opération entraîne malheureusement souvent la destruction de la souche mère, ces colloïdes ayant un effet toxique sur les cellules après chauffage (Mugnier et Jung 1985). L'utilisation du glycérol, du mannitol et de l'amidon réalisé au cours de nos essais a permis d'obtenir de meilleurs résultats. Ces ingrédients naturels sont le plus souvent utilisés lors des opérations de réticulation appliquées aux enzymes (Mandels, et Weber (1969). Les

essais d'applications aux microorganismes que nous avons réalisés ici indiquent que ces fluides sont adaptés au séchage de microorganismes.

Dans le choix des supports, il apparaît très clairement des variations importantes dans les résultats ($P < 0,05$). La figure 21, illustre les différents taux de survies pour chaque support après 1 à 8 mois de conservation à température ambiante. Ces expériences ont été menées de façon à respecter les matières sèches identiques dans tous les cas de mélanges. Le calcul du taux de survie s'est fait en considérant le nombre de survivants juste après le séchage comme représentant 100% des microorganismes totaux. On notera à cet effet que les souches du ferment présentent les taux de mortalité les plus élevés sur le témoin sans support avec 10% de survivants pour les souches de *Lactobacillus plantarum*, et *Rhizopus oryzae* après respectivement 1 et 3 mois de conservation à température ambiante (Fig. 21). Pour la souche de *Lactobacillus plantarum*, le talc et l'amidon de manioc ont les meilleurs taux de survie avec respectivement $25 \pm 4,3\%$ et $33,2 \pm 3,1\%$ de survivants après 8 mois de conservation alors que *Rhizopus oryzae*, présente les meilleurs taux de survie sur gel de silice ($30,1 \pm 2,4$), et sur Amidon de manioc ($30 \pm 3,2$).

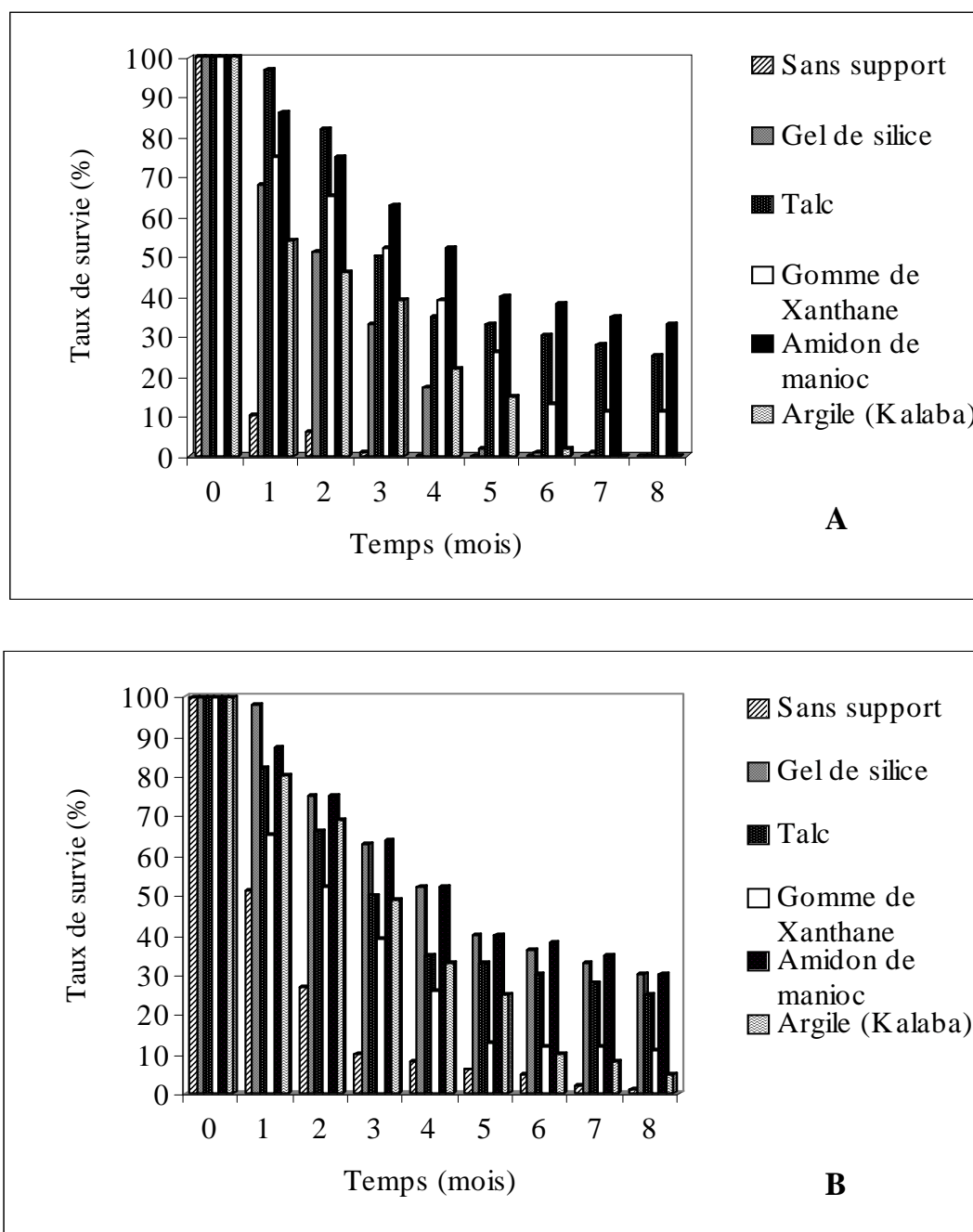


Fig. 21 : Taux de survie des *Lactobacillus plantarum* (A) et *Rhizopus oryzae* (B) du ferment sur différents supports à température ambiante.

La comparaison du taux de survie après 8 mois de conservation à température ambiante indique une différence ($P < 0,05$) entre les échantillons selon les supports quelque soit le microorganisme (Fig. 22). On notera par ailleurs que le support amidon donne des meilleurs taux de survies en considérant les deux microorganismes (Fig. 22).

3- Effet de la température de séchage et du débit d'air sur la survie des souches du ferment.

L'effet de la température sur la survie des souches a été étudié pour des températures variants de 30°C à 50°C. On notera que les souches de *Lactobacillus plantarum* aux températures supérieures à 45°C meurent rapidement (en moins de 30 minutes) lorsqu'elles ont été séchées sans agents de protection, alors qu'elles ont été plus résistantes lorsque séchées à 35°C avec de l'amidon de manioc utilisé comme support (Fig. 22) avec environ 76% de survivants.

De même, les souches de *Rhizopus oryzae*, présentent un meilleur taux de survie lorsqu'elles sont séchées sur amidon de manioc à 35°C avec environ 82±4% de survivants (Fig. 22). On remarquera par ailleurs que les meilleurs taux de survie sont obtenus aux températures de séchage comprises entre 35°C et 40°C.

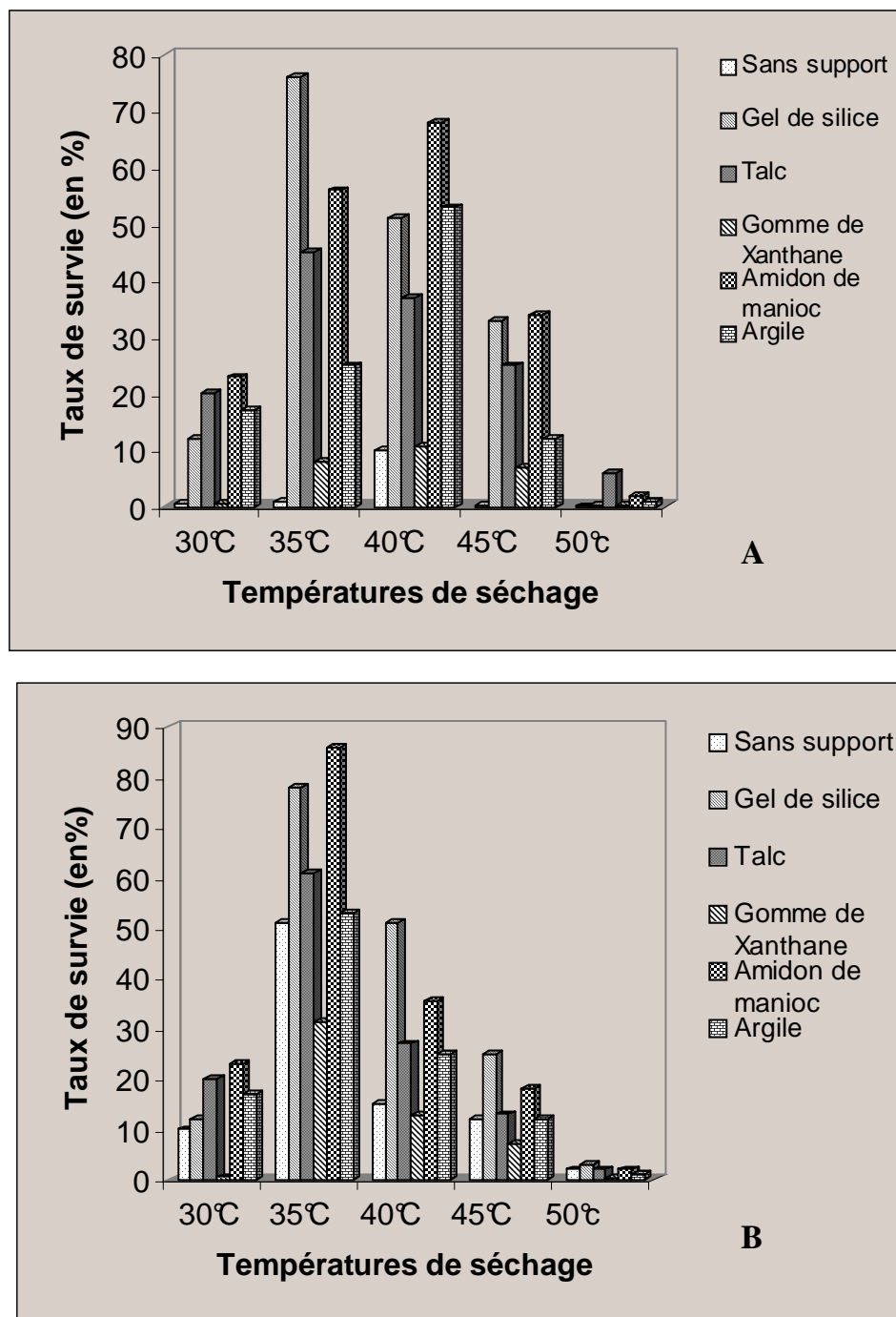


Fig. 22 : Effet de la température de séchage sur la survie de *Lactobacillus plantarum* (A) et *Rhizopus oryzae* (B) immobilisés sur différents supports.

Le but recherché par le séchage des microorganismes est de pouvoir mettre à la disposition des utilisateurs, un concentré de microorganismes sous une forme facile à manipuler. L'option prise de réaliser un séchage découle du fait que Bokanga (2000) indique que les cossettes de manioc séchées sont utilisées dans certaines zones rurales pour accélérer la fermentation naturelle du manioc. La forme séchée nous a donc semblée la plus adaptée pour les zones rurales, car étant une technologie locale. Le but de cette opération de séchage était l'obtention d'une activité de l'eau faible à des basses températures. Ceci évite la prolifération des microorganismes et réduit les effets de réactions chimiques et enzymatiques qui peuvent induire la perte de viabilité chez les cellules séchées (Scott, 1958, Labuya, 1968). Nous avons néanmoins fait face au problème de dénaturation thermique qui a conduit à des baisses de viabilités des germes qui atteignaient dans la plupart des cas les 75%. Or Roblain *et al.*, (1995) indiquent qu'au cours du séchage de microorganismes les taux de survivants devraient avoisiner les 80% à 90% pour espérer conserver les propriétés métaboliques de ces germes. Il est donc à craindre que les multiples traitements thermiques appliqués aux souches soient néfastes pour la conservation des propriétés métaboliques des souches isolées.

La technique de séchage que nous avons utilisé est le séchage sur lit convectif qui a cet avantage d'avoir une distribution uniforme des températures et un excellent coefficient de transfert calorifique entre l'air de séchage (gaz vecteur) et les cellules séchées. Compte tenu des taux de survies fluctuants au sein d'une même température, il nous est paru opportun de dégager l'influence du débit d'air sur le taux de survie à la température optimale. Il a été choisi la température de 35°C pour vérifier l'effet des

débits d'air sur le pourcentage de survie de *Lactobacillus plantarum* et *Rhizopus oryzae*. En effet cette température s'est avérée indiquée car induisant des meilleurs taux de survies, pour les deux microorganismes pris globalement. Le mélange à sécher a été constitué par 1/3 de germes et 2/3 de support d'amidon de manioc de façon à obtenir une matière sèche de départ de l'ordre de 80%. Le séchage a été ainsi nettement plus lent et a permis d'étudier l'évolution de la population sur toute une gamme de débits d'air.

On note globalement un comportement des microorganismes très différent des séchages précédents et variant avec les débits d'air. Il se dégage notamment de ces essais que le maintien à des taux de survies supérieures à 80% peut-être réalisé pour des débits d'air de l'ordre de $10\text{m}^3/\text{h}$ aussi bien pour *Lactobacillus plantarum* que pour *Rhizopus oryzae*. Une fois cette barrière de $10\text{m}^3/\text{h}$ de débit d'air dépassée, nous arrivons comme dans le cas des séchages sans control des débits d'air réalisé précédemment à des pourcentages de survies bien trop bas, de l'ordre de 10% (Tableau 22).

Tableau 22 : Influence du débit d'air sur la survie des microorganismes du ferment au cours du séchage sur lit fluidisé

Microorganismes	Débits d'air (en m ³ /h)	Taux de survie (%)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	15,7±3,4
	5	32,9±5,1
	10	80,6±2,6
	15	42,4±4,1
	20	10,1±2,5
<i>Rhizopus oryzae</i>	0	24,7±3,4
	5	52,5±6,2
	10	97,1±3,6
	15	50,5±9,1
	20	8,7±3,2

V- Conclusion partielle

Au terme de cette partie, il se dégage que le meilleur milieu de multiplication des germes est le milieu CTM de Law *et al.*, avec pour substrat de la farine de son de manioc finement broyée et tamisée, aux quels les ingrédients sources d'azote et autres minéraux nécessaires à la croissance cellulaire ont été ajoutés. Le fluide de protection indiqué est le glycérol, alors que le support le plus adapté a été l'amidon de manioc. Les meilleures températures de séchage sont 35°C pour un débit d'air de 10 m³/h.

Chapitre 6

BIOCONVERSION DU MANIOC CYANOGENE PAR *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ET *RHIZOPUS ORYZAE* SECHES SUR SUPPORT AMIDON

I- Introduction

Les souches de *Rhizopus oryzae* et *Lactobacillus plantarum* isolées en plus des potentialités réelles de bioconversion des tubercules de manioc qu'elles présentent, sont aptes à supporter les traitements de séchage. Malheureusement, malgré l'activité β -glucosidase importante observée, des taux assez élevés en glucosides cyanogénétiques sont présentes dans les tubercules fermentés à l'aide de starter (Cf chap. 3). L'hypothèse d'un blocage de l'activité au niveau de la cyanohydrine due à l'abaissement du pH (Cooke, Blake et Battershill 1978) a été admise et vérifiée au chapitre 4. La question de recherche qui se pose ici est celle de savoir comment assurer l'étape de dégradation de la cyanohydrine en acide cyanhydrique? L'hypothèse de recherche y dérivant est que si nous additionnons une base au milieu en cours de fermentation après la 24^{ème} heure c'est à dire au moment où la majeure partie des glucosides cyanogénétiques sont transformés en cyanohydrines (Brauman *et al*, 1995), il se pourrait que les processus chimiques de dégradation de la cyanohydrine en acide cyanhydrique puissent évoluer normalement.

Par ailleurs, Mugnier et Jung (1985) indiquent que les traitements thermiques appliqués aux microorganismes sont susceptibles d'induire une perte partielle et parfois même totale d'activité enzymatique chez les souches. Les multiples traitements thermiques appliqués au cours du séchage à nos deux souches ne peuvent ils pas

causer la perte des propriétés métaboliques de nos deux souches? Les objectifs de cette partie du travail sont dans un premier temps d'évaluer l'effet de l'addition du NaOH après la 24^{ème} de fermentation, sur la dégradation des cyanohydrines d'une part, et d'évaluer les performances, du ferment sur support amidon sur les tubercules de manioc cyanogènes. Cette évaluation porte essentiellement sur la durée du rouissage, la réduction des glucosides cyanogénétiques, l'amélioration du taux de protéines totales et la qualité microbiologique du manioc roui vis à vis du développement de quelques germes pathogènes.

II- Matériel et méthodes

1. Préparation et utilisation du ferment

Le rouissage a été effectué par ensemencement des tubercules de manioc par des microorganismes sur support d'amidon composé de *Lactobacillus plantarum* contenant 10⁹ufc/g de support, et de *Rhizopus oryzae* contenant 10⁶spores/g de support.

Les microorganismes sur support ont été au préalable reconstitués à 20% dans de l'eau peptonée puis pré incubés pendant 2 heures à température ambiante des manière à avoir des concentrés de 10⁶ufc/ml *Lactobacillus plantarum*, et de *Rhizopus oryzae* contenant 10³spores/ml avant utilisation.

2. Méthodologie

Les racines de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) de variétés amères non altérées achetées sur le marché de Ngaoundéré, ont été lavées, épluchées, puis

découpées. Des lots de 500 g ont été réalisés. Un premier lot a été immergé dans de l'eau de puits, dans un erlen de 1 L, et sert de témoin de rouissage naturel au laboratoire. Un second lot est pasteurisé à 80°C pendant 15mn puis immergé dans de l'eau distillée stérile puis,ensemencé par le ferment après refroidissement à environ 30°C, a été incubé avec le premier lot, à température du laboratoire. Après 24 heures de rouissage, du NaOH 0,01N est ajouté dans les proportions de 10%. Ceci sert de témoin de rouissage avec le ferment. Une expérimentation préalable avec de l'acide lactique à 10g/l indique un pH voisin de 3,5. Pour ramener le pH de 100ml de cette solution à 5,5 il a fallut une chute de burette de 10ml de NaOH 0,01N.

Parallèlement des prélèvements ont été effectués chez une ménagère qui réalise une fermentation en puits dans un trou creusé à même le sol, rempli d'eau, par immersion des tubercules. Ceci constitue le témoin de fermentation naturel traditionnel. Des portions de tubercules ont été alors prélevées toutes les 24 heures dans tous les témoins pour analyses physico-chimiques, biochimiques et microbiologiques.

4. Méthodes analytiques.

Analyses physico-chimiques et biochimiques

Le pH, l'indice de pénétrométrie, la concentration en cyanures totaux résiduels, le taux de protéines totales ont été déterminées selon les mêmes méthodologies d'évaluation décrites dans les chapitres précédents.

Numération de la microflore pathogène.

Le suivi de l'évolution de la microflore au cours des différents rouissages se fait sur des échantillons prélevés toutes les 24 heures, par les méthodes classiques de dénombrement en boîtes de pétries d'après les méthodes de Buttiaux *et al.* (1974). En utilisant le milieu EMB (éosine méthylène bleu) pour les coliformes totaux, et TSN (Trypcase-Soy-Néomycine) pour les sulfite réducteurs.

III- Résultats et discussions.

Potentiel d'hydrogène

On note une baisse plus accentuée du pH lors du rouissage avec le ferment des les 24 premières heures comparativement aux rouissages naturels (Fig. 24). Le pH passe ici de 6,9 à 6,5 pour un rouissage naturel au laboratoire, à 5,2 pour le rouissage chez la ménagère, à 3,5 pour le rouissage avec le starter mixte et 6,9 pour le rouissage stérile. La baisse plus accentuée au cours du rouissage avec le ferment mixte, pourrait être dû à une introduction massive des Lactobacilles du ferment dont l'activité de synthèse des acides organiques contribue à abaisser le pH (Giraud *et al.*, 1992). Ceci pourrait être bénéfique dans le sens de l'amélioration de la qualité hygiénique des dérivés du manioc, et de l'amélioration de la durée de conservation des dérivés du

manioc. En effet les bactéries lactiques introduites étant amylolytiques, se sont multipliées rapidement sur amidon de manioc. Ce métabolisme de l'amidon abouti à la production des acides organiques, notamment de l'acide lactique (Giraud *et al.*, 1992). Ces acides, limiteraient considérablement le développement des microorganismes indésirables ou pathogènes. Keleke *et al.* (1995), indiquent que pour que l'action stabilisatrice soit efficace, il faut que l'acidification soit rapide et qu'en moins de 24 heures, le pH s'abaisse aux environs de 4, ce qui a été le cas ici s'agissant de la fermentation avec le ferment mixte (Fig. 24).

Après addition de NaOH 0,01N, le pH s'élève brusquement jusqu'aux environs de 5,5 puis s'y stabilise 24 heures avant de reprendre une allure descendante (Fig. 23). Cette stabilisation du pH aux environs de 5,5 pendant 24 heures seraient suffisantes pour assurer la dégradation de près de 90% de cyanohydrines en acides cyanhydriques (Ampe et Brauman, 1995)

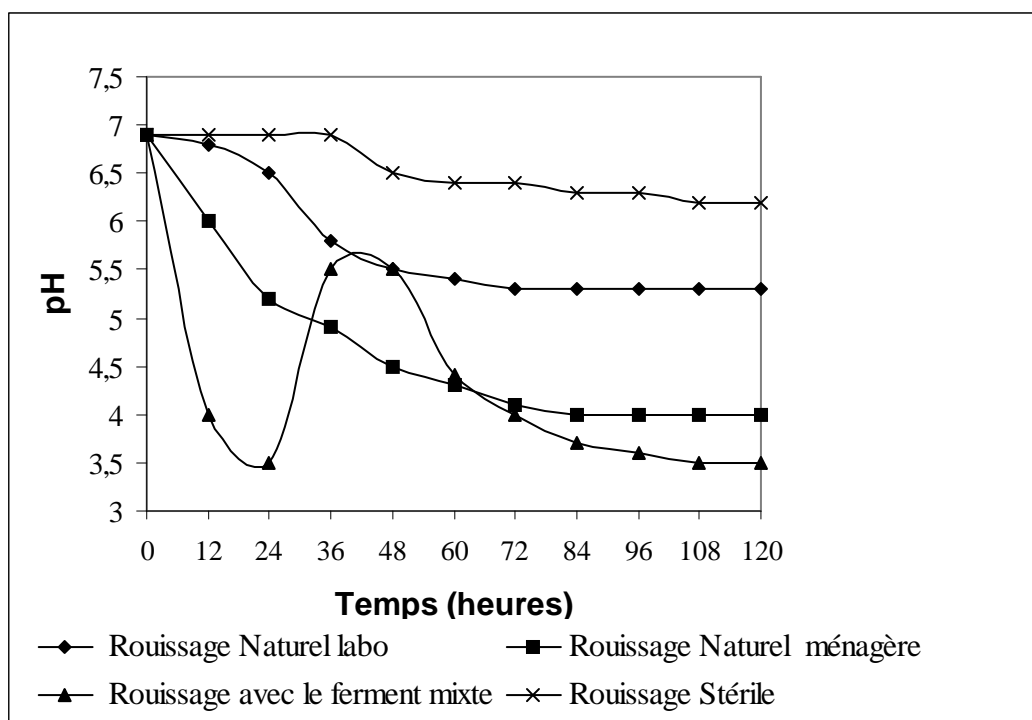


Fig. 23 : Evolution du pH au cours des différents essais de rouissage.

Ramollissement.

Le ramollissement ici a été plus rapide dans le cas du rouissage avec le ferment (Fig. 24) comparativement aux rouissages naturels et stériles. L'indice de pénétrométrie indique déjà une valeur de 12mm/5s dès la 48^{ème} heure par utilisation du starter mixte, valeur atteinte seulement à la 120^{ème} heure pour un rouissage naturel. Cette accélération du ramollissement pourrait être due à la présence dans le ferment des microorganismes capables de produire la pectine hydrolase et la polygalacturonase, enzymes qui contribuent à la dégradation des pectines (Ampe *et al.*, 1995). La pectine étant par ailleurs, le constituant majeur de la paroi cellulaire, et responsable de la rigidité de la pulpe du manioc (Bombily, 1995). Le ramollissement

obtenu ici n'est pas le fait d'un stress physique mais, on observe plutôt ici une dissociation progressive des tissus cellulaires qui fait penser à une désintégration de structures. Ampe *et al.*, (1995) indiquent à cet effet, que le ramollissement du manioc n'est pas seulement le fait du stress physique, mais surtout de l'activité des enzymes pectinolytiques, dont la pectine hydrolase et les polygalacturonases.

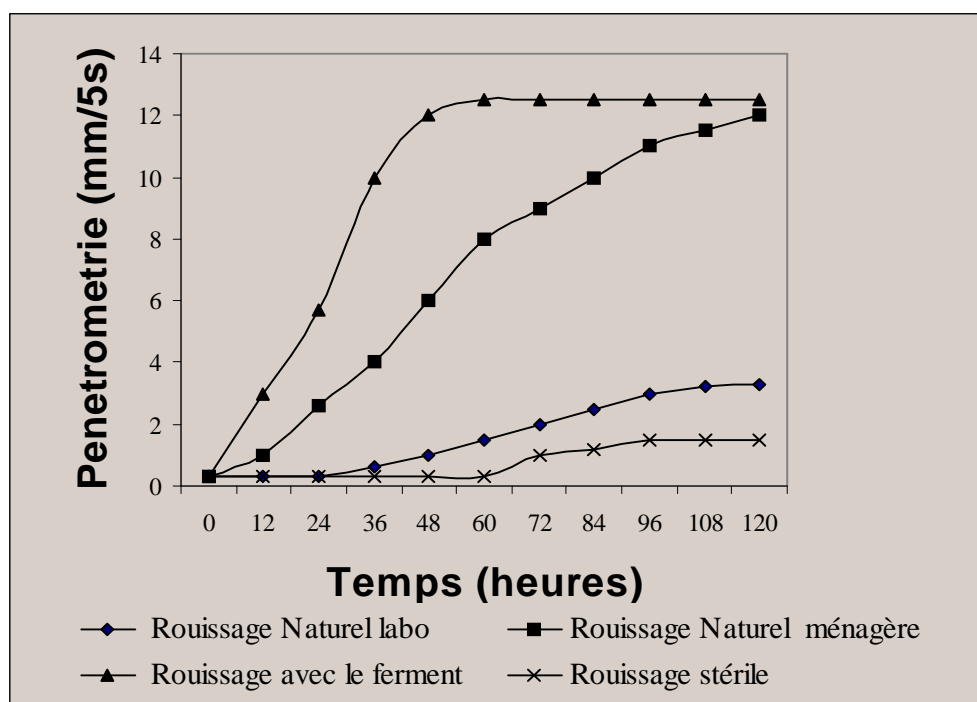


Fig. 24. Evolution du ramollissement au cours des essais de rouissage

Les cyanures et les protéines totaux.

Les dosages effectués en fin de fermentation, nous ont permis de constater qu'au cours de la fermentation par le ferment, les glucosides totaux ont été réduits de près de $95\pm 4\%$, comparativement aux rouissages naturels où on observe des taux d'élimination de moins de 50% (Fig. 25). Ampe et Brauman, (1995) font remarquer que la linamarase endogène présente dans les racines de manioc semble suffisante pour assurer l'élimination de la linamarine. Mais le rouissage stérile effectué ici indique que les taux de glucosides résiduelles est encore à un taux important (175ppm). Par contre, le rouissage avec le starter composé de la souche de *Lactobacillus plantarum* à activité linamarase, indique une baisse importante du niveau résiduel de cyanures totaux. Ikédiobi *et al.*, (1985) montre que l'addition de la linamarase exogène pendant la phase de fermentation permet de réduire la quantité de cyanures résiduels qui passe de 200ppm en début de fermentation à 25ppm. Ce taux est d'ailleurs en dessous des taux recommandés par le codex alimentarius (FAO/codex alimentarius, 1991). La microflore exogène contribue donc à améliorer l'élimination des cyanures présents dans le manioc. Okafor (1984) vient confirmer cette assertion par l'isolement de plusieurs bactéries capables de dégrader la linamarine. La forte diminution observée au cours du rouissage avec notre ferment, est donc liée à une activité linamarase exogène intense (des microorganismes du ferment). Giraud *et al.* (1995) comparant l'effet de l'inoculation de la pulpe de manioc par *Lactobacillus plantarum* A6 (amylolytique) et *Lactobacillus plantarum* Lacto labo (non amylolytique), ont indiqué que la linamarine disparaissait complètement dans tous les cas, en moins de 5 heures. Mais comme

observé au cours du chapitre 4, la linamarine disparaît mais les glucosides totaux restent élevés. Ce fait s'est expliqué par le fait qu'il y avait accumulation d'un autre composé toxique issu de la dégradation de la linamarine : la cyanohydrine (Cooke, Blake, Battershill, 1978). Le pH acide ayant été incriminé comme responsable du blocage de la dégradation de la cyanohydrine en acide cyanhydrique, nous avons introduit une base dès la 24^{ème} heure. Les résultats indiquent une nette diminution du taux des glucosides totaux en fin de fermentation (Fig. 25).

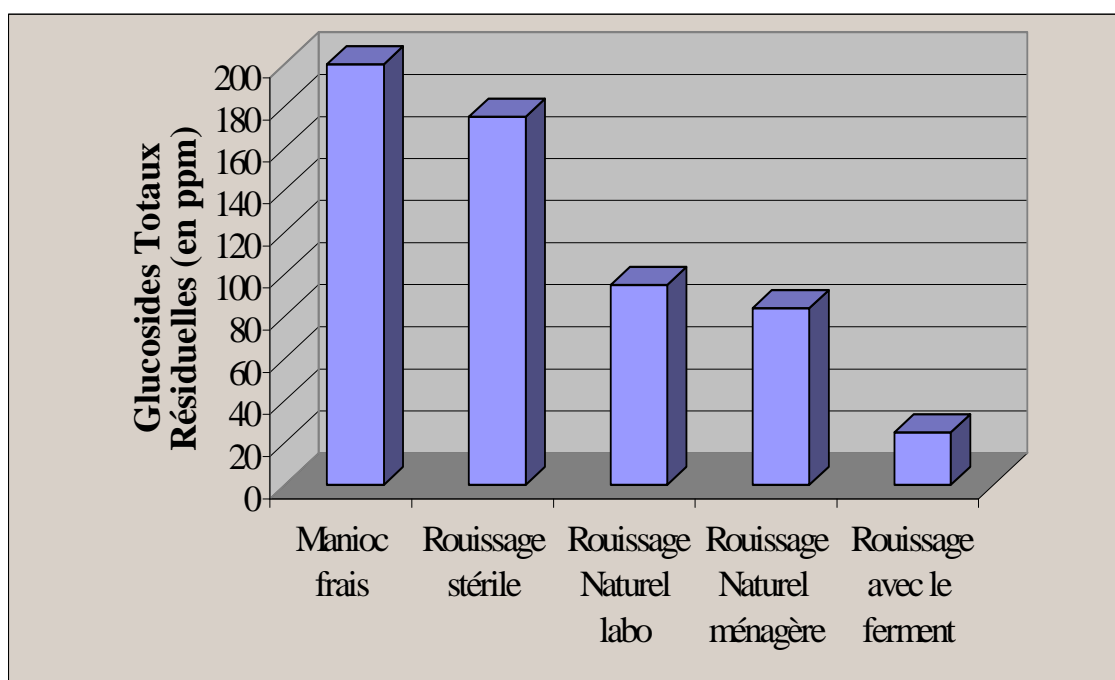


Fig. 25: Distribution des glucosides résiduels totaux après rouissage des tubercules de manioc par nos différentes formulations du Starter.

Les protéines totales.

Les protéines totales, augmentent de 10 ± 2 % avec le ferment alors que l'on n'observe pas de différence ($P < 0,05$) entre les taux de protéines dans le manioc frais, comparativement au manioc rous de manière naturelle (Fig. 26). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nous avons introduit massivement des moisissures (*Rhizopus oryzae*) par le biais du ferment, ces champignons étant amylolytiques, se seraient immédiatement multipliés en induisant une biomasse importante en fin de fermentation, ceci aurait eu pour corollaire l'augmentation de la valeur protéique du

manioc après fermentation avec le ferment, les champignons par leurs corps protéiques étant une source de protéines de qualité (Yandju, 1989).

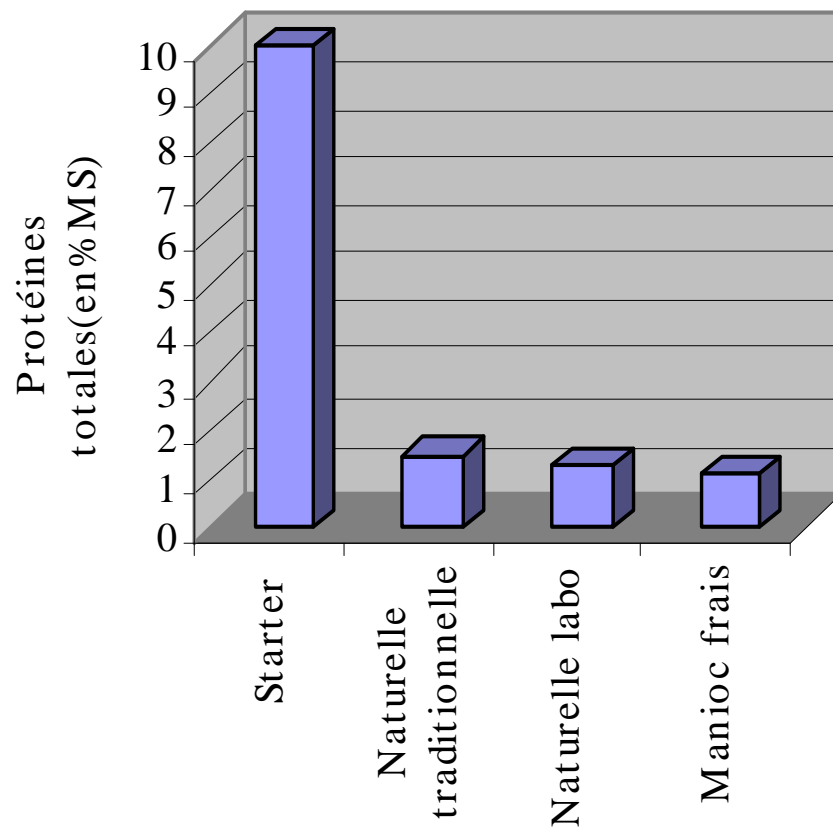


Fig. 26: Distribution des protéines totales après rouissage

Les pathogènes.

On remarque une nette diminution des coliformes et des clostridiiums au cours du rouissage avec le ferment comparativement aux rouissages naturels (Fig. 27 et Fig. 28). Ceci pourrait s'expliquer par l'activité des bactéries lactiques que nous avons massivement introduites dans le milieu. En effet, ces bactéries en produisant des acides organiques pourraient jouer un rôle déterminant dans l'amélioration de la qualité hygiénique du manioc. L'effet antiseptique des acides lactique et acétique liée à leurs formes dissociées, leur permet d'entrer dans les cellules bactériennes où ils s'ionisent et s'accumulent, provoquant un abaissement interne du pH et le blocage de mécanismes de transport (Abe et Lindsay, 1978, Nout *et al.*, 1989). De plus au cours de la fermentation, le métabolisme des bactéries lactiques en présence du CO₂, dégagé, conduit à une accumulation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), autre antiseptique puissant contre les germes pathogènes intestinaux (Perdigon *et al.*, 1990, Brauman *et al.*, 1995). Dans le même sens, Svangberg *et al.* (1990, 1991a et 1991b) ont réalisé des études spécifiques concernant l'effet de la fermentation lactique sur la diminution de *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Shigella dysenteriae*, et les implications sur l'état des populations d'enfants alimentés avec des produits amylacés après fermentation lactique. Ils ont conclu à des effets très positifs de la fermentation lactique sur la diminution des risques de diarrhées chez ces populations infantiles. Ces observations viennent conforter les résultats que nous avons eus par l'utilisation du starter mixte.

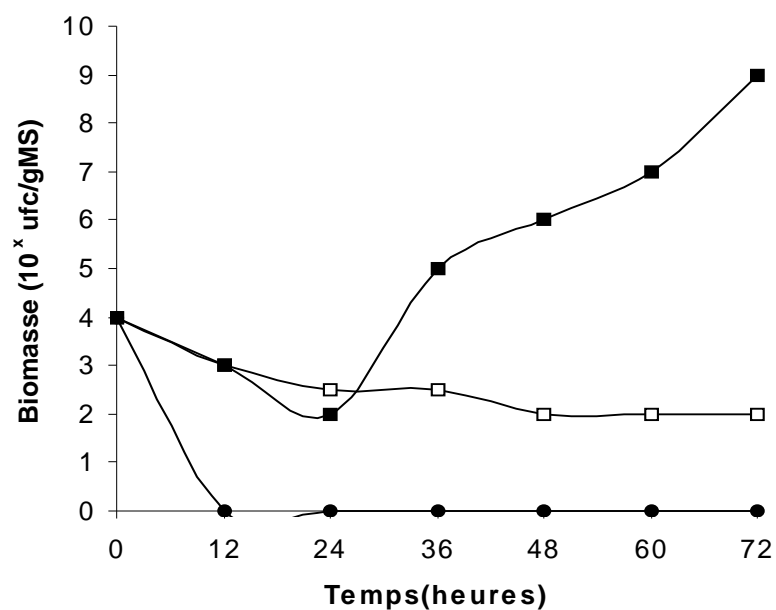


Fig. 27 Evolution des entérobactéries totales au cours du rouissage naturel au labo(□) du rouissage naturel d'une ménagère (■) et du rouissage avec le ferment (●)

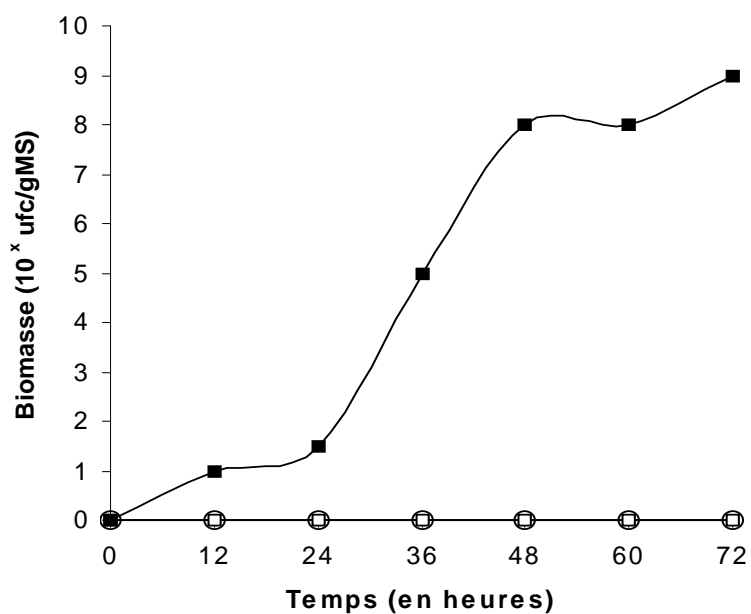


Fig. 28 Evolution des sulfito-réducteurs totaux au cours du Rouissage naturel au labo(□) du rouissage naturel d'une ménagère (■) et du rouissage avec le ferment (○)

IV- Conclusion partielle

Au terme de cette partie, Il apparaît que Les traitements thermiques appliqués au cours du séchage n'ont pas entamés les propriétés métaboliques des souches isolées et utilisées comme starter. Comparativement aux résultats obtenus au cours des expérimentations avec les microorganismes non séchés (Cf. chapitre 3), nous constatons que les rendements de bioconversions obtenus sont conservés. Mais ici le taux de glucosides totaux résiduels baissent effectivement, ceci étant corollaire à l'abaissement dès la 24^{ème} heure du pH consécutif à l'ajout du NaOH. D'autre part, l'utilisation du ferment composé de *Lactobacillus plantarum* et *Rhizopus oryzae*, a permis d'avoir un ramollissement plus rapide (12mm/5s), un meilleur rendement de détoxication (taux résiduels de glucosides totaux avoisinant les 5% seulement), un gain en protéines non négligeable (10%), et une meilleure qualité hygiénique des produits dérivés du manioc.

CONCLUSION GENERALE

Le travail abordé ici, en prenant en compte l'étude d'un cas d'utilisation de ferment à deux microorganismes, essaie d'élucider par des analyses physico-chimiques, biochimiques et microbiologiques de routine l'ensemble des situations, relativement aux conditions de production et de conservation des microorganismes destinés à la fermentation du manioc. Ceci a été le support d'une réflexion sur les conditions de viabilité des germes séchés sur supports locaux et de leur utilisation comme ferment pour un rouissage contrôlé du manioc cyanogène.

Dans cette optique, des souches de microorganismes ont été isolées des cosettes de manioc anhydres. Parmi la centaine des souches isolées, *Lactobacillus plantarum* et *Rhizopus oryzae* se sont avérées intéressantes pour le rouissage du manioc. En effet ces deux souches ont présenté de fortes habilités à produire l' α -amylase, la β -glucosidase, et des polygalacturonase. En outre les deux souches ont présenté les meilleures aptitudes de croissance sur milieux à base d'amidon de manioc. Utilisées en cultures pures et en cultures mixtes, les deux souches ont présenté des capacités réelles de bioconversion de la pulpe du manioc, notamment dans le sens du ramollissement et de la dégradation des composés cyanés. Leur utilisation comme ferment pour rouissage du manioc, en tenant compte de quelques conditions physiques optimales préalablement déterminées à savoir une température de 30°C et un pH de 5,5, a permis de réduire de 95% les glucosides totaux, de ramener la durée du rouissage à 48 heures maximum, et d'améliorer les taux de protéines totales. Des essais de conservation de ces microorganismes sur supports locaux ont permis de dégager quelques paramètres externes nécessaire pour leur séchage notamment les

possibilités d'utiliser l'amidon de manioc comme support et le glycérol comme fluide protecteur.

Dans un contexte caractéristique d'un regain d'intérêt pour la transformation du manioc lié aux multiples contraintes largement abordées en introduction, ce travail aura eu le mérite de répondre à quelques-unes des attentes des principaux acteurs de la filière manioc. En effet quelques contraintes, ont été levées notamment celles relatives à la détoxication, à la réduction du temps de rouissage, aux possibilités de présenter le starter sous forme séchée donc facilement manipulable par les paysans des zones rurales.

PERSPECTIVES

Malgré ces premiers essais encourageants, nous avons noté quelques problèmes dont la résolution est préalable à une éventuelle vulgarisation du ferment.

Sur le plan technique il conviendra de:

- procéder à une analyse moléculaire des souches afin de confirmer l'identification des espèces.
- étudier la stabilité génétique de la microflore du ferment, dont le rendement de bioconversion baisse énormément après séchage au cours du temps (résultats observés non montrés) ;
- concernant le séchage des microorganismes du starter, les paramètres étudiés ici demeurent très limités pour conclure à une optimisation du procès. En effet il serait très intéressant de réaliser un séchage sur lit fluidisé et voir l'effet du cisaillement des particules sur les microorganismes.

- Il serait aussi nécessaire de dégager l'effet de l'épaisseur de la pâte séchée sur la survie des microorganismes ;
- comparer le séchage aux autres méthodes de conservations, notamment l'encapsulation.
- utiliser ce ferment sur un mélange de racines de manioc de variétés différentes, comme au cours d'un rouissage traditionnel. Ceci pourrait ne pas donner des produits finis de qualités organoleptiques identiques, la variété du manioc utilisée étant fortement tributaire de la qualité du produit fini.

Sur le plan socio-économique :

- l'utilisation de ferments pour la fermentation du manioc n'est pas chose courante, ce nouveau « paquet technologique » est-il assez intéressant pour être introduit dans les pratiques traditionnelles de détoxification du manioc au Cameroun?
- l'utilisation des ferments représentent-ils une alternative crédible et durable en matière de développement de l'industrie de transformation du manioc?
- ce ferment peut-t-il induire des prémisses d'une professionnalisation de l'industrie de transformation du manioc encore dans sa phase artisanale ?
- les industriels et de nombreux commerçants peuvent-ils valablement s'appuyer sur des microorganismes pour conduire des unités de transformation alimentaire du manioc ?

Ces interrogations aussi pertinentes qu'elles soient nous paraissent quelque peu utopiques et ce constat bien qu'il apparaisse très pessimiste et sans complaisance, n'est pas dénué de tout fondement.

Quelles que soient les nombreuses questions de recherche que cette thèse soulève comparativement aux problèmes résolus, la contribution scientifique apportée par ces résultats, peut apparaître positif, voir promoteur, et en prenant acte, la question essentielle devient à nouveau celle des formes appropriées, d'utilisation des microorganismes pour l'amélioration des procédés traditionnels Africains. De ce fait nous osons croire par la justesse des observations relevées au cours de ce travail, pouvoir stimuler la réflexion vers la poursuite des investigations en matière de biotechnologie orientée vers l'amélioration de la qualité de nos aliments traditionnels en général et particulièrement, le manioc.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abe M., Lindsay R., (1978) - Evidence for lactic streptococcal role in acid cassava. *J.Food Protection*, 42: 781-784.

Agbor Egbe T., Mbome L.I., Noubi L. et Trèche S., (1995)- The effectiveness of cyanogens reduction during cassava processing into miondo *In* Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon (D.), Trèche (S.) éd.s.: *Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris.: pp.307-318.

Agin, G.L. and Blau, G.E, (1982)- Application of DACSL (Dow Advanced Continuous Simulation Language) to the design and analysis of chemical reactions systems. *In* R.S.H. Math and G.V. Reklaitis ed., Selected topics on computers aided process design and analysis. AICHE Symposium Series 214 American institute for chemical Engineers, New York., 78, 108-118

Ampe F., Brauman A., (1995)- Enzymatic origin of detoxification and root softening in cassava retting. *World. J.of Microbio. Biot.*, 87.375-381.

Ampe F., Brauman, A., Trèche S., Agossou A.,(1994)- The fermentation of cassava : optimisation by the experimental research methodology. *J. of the science of Food and Agriculture*, 65. 355-361.

Ampe F., Keleke S., Robert H., Brauman A., (1995)- The role and origin of pectin degrading enzymes during cassava retting. *In* Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon (D.), Trèche (S.) éd.s.: *Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris.: pp.331-344

Ampe F., Brauman, A., (1995) -Enzymatic origin of detoxification and root softening in cassava. *World. J. of Microbiol. Biotechnology*,.

Andrew, J.F., (1968)- A mathematical model for the continuous cultures of microorganisms utilising inhibitory substrates. *Biothechnol. Bioeng.* 10 : 707-723

Ayernor G.S., (1985) - Effect of the retting of cassava on product yield and cyanide detoxification. *Journal of Food Technology*, 20: 89-96,

B

Brisou, J., (1971) - Techniques d'enzymologie bactérienne, Masson et C^{ie} Eds. 290 pages.

Baena M., Tylleskar T., Rosling H., (1997) - Konzo and ebola in Bandundu region of Zaire, *J Fruits-vegetables-and-nuts* éd :Lancet9052 : 349- 621

Brauman, A., Kéléké, S., Mavoungou, O., Ampe, F., et Miambi, E., (1995). "Etude d'une fermentation lactique traditionnelle des racines de manioc en Afrique Centrale (Congo)". In Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon (D.), Trèche (S.) éd.: *Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris.pp 35-46

Block S.S, Stearns T.W., Stephens R.L., et Mc Candless R.F.J.,(1983)- Single Cells Proteins production. *J. Agr.Food Chem.*, 1: 1890-1901

Bokanga M., (2001)- CASSAVA: Post-harvest Opérations, éd. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria, 220 p

Bombily M.S., (1995).- Le manioc : une ressource alimentaire importante en Guinée In Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon (D.), Trèche (S.) éd.: *Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris.pp.56-61

Bourdoux P., Seghers P., Mafuta M., 1982- Cassava Products : HCN content and detoxification processes. *In* Delange (F.), Iteke (F.), Ermans (A.), éd.: Nutritional factors involved in the goitrogenic action of Cassava. Ottawa. Int. Development Research Center, pp 234-246.

Braude R., (1942)- SCP utilisation, *J. Inst. Brew.*, 39,206-215

Brauman, A., Keleke, S., Malonga, M., Ampe, F., (1995) - Microbiological and biochemical aspects of cassava lactic fermentation in Central Africa. *In* international meeting on cassava flour and starch, Cali, Columbia, CIAT Seminar,

Brauman, A., Kéléké, S., Mavougou, O., Ampe, F., et Miambi, E., (1995)- Etude d'une fermentation lactique traditionnelle des racines de manioc en Afrique Centrale (Congo)". *In* Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon (D.), Trèche (S.) éd.: *Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris.

Brisou, J., (1971) -Techniques d'enzymologie bactérienne, (Eds Masson et C^{ie}) 290 pages

Butler, G.W., (1965) -The distribution of the cyanoglucosides linamarin and lotostralin in higher plants. *Phytochemistry*, 4 :127-131

Buttiaux, R., Beerens, H., Taquet, A.,(1974)- Manuel de techniques bactériologiques, 4^{ème} ed. Flammarion, Paris, 70p

C

Chuzel G.(1990) -“ Almidon de yucca, uso actual y potencialidades” *Cassava Newsletters*, 15 (1): 9-11.

Codex alimentarius Commission, (1988)- Repport of the eigth session of the codex coordinating committee for Africa. FAO/WAO, Cairo Egypt.123 ppges

Collar, P., Lévy, S., (1959)- A two stage fermentation of cassava. *Nature*, 183 : 620-621.

Cooke, R.D., Blake G.G., Battershill, J.M., (197)- Purification of cassava linamarase. *Phytochemistry*,17: 381-383

Coon, E.E (1969)- Cyanogenic glucosides. *J. Agric.*17, 519-526

D

de Bruinjn, G.H. and Fresco,C.O., (1989)- The importance of cassava in world food production. *Netherland journal of Agricultural Sciences*, 37, 21-34.

Devani, M.B., Shishoo, Shah,S.A. Suhagia B.N., (1989) - Spectrophotometric for the microdetermination of nitrogen in Kjedhal digestion. *J. Assoc. Offic.Anal. Chem.* 72 (6) 953-956.

Djouldé, D.R. (1998) - Effet de la fermentation sur les composés cyanogénétiques du Manioc”, Mémoire de maîtrise de Biologie Appliquée, Faculté des Sciences Université de Ngaoundéré.62 pages

Djouldé, D.R., Essia Ngang J.J, Etoa F-X., (2000) - Amélioration du rouissage du manioc cyanogène, *Biosciences Proceeding*, 7 : 126-134

Dolczil, L. et Kirsop B.H., (1977) The use of the API Lactobacillus system for the characterisation of pediococci. *J. Appl. Bact.*, 42,213-217.

De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., (1960)- A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23 :130-142

E

Edwards, V.H.,(1970)- The influence of high substrates concentrations on microbial Kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 12 : 679-712.

Ejiofor, M.A.N., Okafor N. (1981)- « Comparision of pressed and unpressed cassava pulp for gari making » ; *Tropical root crops : research strategies for the 1980* Terry E.R., Oduro K.A., Caveness eds FDRC, in Ottawa, Canada pp. 154-159

Ermans, A.B., (1972) -Possible rôle of cyanide and thiocyanate in the etyology of endemic cretinism in human development and thyroic gland. Standbury (J.B.) & Kroc (R.L.), Eds Plenum Press, N.Y., pp. 455-486

Esser, A.J.A, Nout, M.J.R., (1989)- The safety of dark, moulded cassava flour compared with withe - A comparison of traditionally dried cassava pieces in North East Mozambique. *Tropical Agriculture*, Ibadan, Nigeria, pp.7-10

Essers, A.J.A, Alsen P., Rosling, H.,(1992)- Insufficient processing of cassava induced acute intoxications and the paralytic disease konzo in a rural area of Mozambique *Ecology-of Food and Nutrition*; 27 (1) 17-27

F

Frankel D.G., (1982). Metabolism and Gène expression. In J.N. Strathern, E.W.Jones et J.R. Broach Eds. *The molecular Biology of the yeast Saccharomyces*, Cold Spring Harbord New-York, pp. 1-37

G

Giamarchi P., Trèche S. , (1995) - « Fabrication de bouillies de sevrage de haute densité énergétique à base de Manioc » In Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon

(D.) Trèche (S.) éd. :*Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris; pp.233-249

Giraud, E., Gosselin, L., Rimbault, M., (1992)- Degradation of cassava linamarin by lactic acid bacteria. *Biotechnol. Lett.*, 14 :593-598.

Giraud E., Champalier A., Rimbault M., (1994) - Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (12) : 4319-4323

Giraud, E., Brauman, A., Kéléké, S., Gosselin L., Rimbault M., (1995). Contrôle de la fermentation du manioc pour un meilleur gari : Utilisation d'un ferment de *Lactobacillus plantarum* à activité linamarase et amylase In Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon (D.) Trèche (S.) éd. :*Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris.

H

Hammes, W. P., Weiss, N., Holzapfel, W., (1992)- The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In Prokaryotes Eds. B. Albert, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, H.K. Schleifer. 2nd Eds., New York Inc. Springer- verlag 2:15-24

Halkier, B.A., et Moller B.L., (1990)- The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Identification of three hydroxylation steps in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Involvement of 1-acid-nitro-2-(p-hydroxyphenyl) ethane as an intermediate. *Journal of biological Chemistry* 265, 21114-21121.

Halkier, B.A., Lykkesfeld, J., Moller B.L., (1991)- 2-Nitro-3-(p-hydroxyphényl) propionate and acid-1-nitro-2-(p-hydroxyphenyl) ethane, two novel intermediate in the

bisynthesis of the cyanogenic glucoside dihurin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Proceedings of the National Academy for Science USA*. 88: 487-491.

Harrigan, W.F. and Mc Cance, M.E. (1976)- Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Sci. Food Agric* London. Academic Press. 32: 1145-1150.

Hunfeld, H., Suhgihara T.F., (1982)- Optimised mycelium production *Mycologia*, 44: 605-618

I

Ikediodiobi, C. O., Onyia, G.O.C., Eluwa, C.E., (1980)- A Rapid and Inexpensive Assay for Total Cyanid In Cassava (*Manihot esculenta* Crantz and Cassava Products) *Agr.Bio. Chem.*, 44: 2803-2809

Ikediodiobi, C.O., Ogundu, E., Ukoa, A.,(1985)- Production of linamarase by *Aspergillus sydowi* and *Fusarium equiseti*. *Process Biochem.*, 20 : 99-102.

K

Kandler , O., Wiess, N., (1986)- Regular, non-sporing gram-positive rods. In Sneath (P.H.A.), Mair (N.), Sharpe (M.E.), Holt (J.G), éd.: Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore. Williams and Wilkins 2: 1208-1234.

Kéléké, S, Koumpolo-Kimpolo, L., Brauman, A. (1995)- Origine de l'activité amylasique dans la fermentation lactique des racines du manioc In Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon (D.) Trèche (S.) éd. : *Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris. pp-319-328

Khetarpaul, N., Chauhnan B. (1989)- Effect of fermentation by pure cultures of yeast and *Lactobacilli* on Phytic acid and polyphenol content of pearl millet *J. Food Sci.*, 54 :780-800.

Kreger-van Rij N.J.W., (1984)- The yeasts, a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam. 577 pages

L

Lancaster, P.A., Coursey, D.G., (1988)- Techniques traditionnelles de traitement après récolte de principales denrées périssables tropicales ; *Bulletin des services Agricoles de la FAO* N° 59

Larpent, J.P., and Larpent-Gouraud, M. (1985)- *Eléments de Microbiologie*. Eds Hermann. 345 pages

Laure Bichon (1981) - Le manioc Développement et Santé, n°35 pp 34-40

Law, K.N., Lapointe, M., and Valade, J.L., (1983)- Production of CTMP from aspen, *In. International Mechanical Pulping Proceeding. TAPPI Proceedings* pp. 259-270

Ludwik H., Harper T., Hawlett R., Edwards, T. (2003)- Microbial Changes www.cbs.knaw.nl/publications/online/7liquid.htm

M

Mathieu, D., Phan-Tan-Luu, R., (1980)- Nemrod Software, L.P.R.A.I., Université d'Aix- Marseille III, France.

Mair, N., Sharpe, M.E., Holt, J.G, (1960)- Bergey's Manual of systematic bacteriology.. Baltimore. Williams and Wilkins 2: 1208-1234.

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

Malek, T., (1986) - Theoretical and methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms. Academic Press, 456 ppges.

Mandels, M. and Weber J., (1969)- The production of cellulases
Adv.Chem.Ser. 95, 391-414.

Massamba, J., Trèche, S., (1989)- Transformations traditionnelles, formes de consommation et formes de commercialisation du manioc en milieu rural congolais".
.Communication présentées au *4th triennial symposium of the International society for tropical root crops-Africa Branch*, 4-9 décembre 1989, Kinshasa, Zaïre

Massamba, J., Trèche S., (1993) - Facteurs influençant les modalités de rouissage du manioc au Congo. Communication présentée au colloque *Anthropologie alimentaire et développement en Afrique intertropicale: du biologique au social*, 27-30 avril 1993, Yaoundé, Cameroun

Massamba, J., Trèche, S., (1994) - Influence de l'urbanisation sur la consommation de la chikwangue au Congo. *In* Ofori (F.) and Hahn (S.K.), éd.: *Tropical Root Crops in a developing economy*, proceedings of the ninth symposium of the International society for tropical root crops, Accra, Ghana, 20-26 octobre 1991: pp.297-303

McLennan. (1965)- Aerobic Bacteria Culture in agitated fermentor. *J. Gen. Microbiol.*, 6(3), 39-42

Meuser, F., Smolnik, H.D. (1980) - Processing of cassava to Gari and other foodstuffs. *Starch*, 32, (4), 116-122

Mlingi, N.V, Assey, V.D., Swai, A.B.M., McLarty, D.G., Karlen, H., Rosling H. (1993).- Determinants of cyanide exposure from cassava in a konzo-affected

population in northern Tanzania *International-Journal-of-Food-Sciences-and-Nutrition*; 44 (2) 137-144, 25

Mpong, O.E., Yan, H., Chism, G., Sayre R.T., (1990) -Purification, characterization and localisation of linamarase in cassava. *Plant Physiology* 93,176-181

Mugnier, J., Jung G., (1985)- Survival of Bacteria and Fungi in Relation to Water Activity and the Solvent Properties of Water in Biopolymer Gels. *App and Env microbial*. 50 (1) 108-114.

Multon, J., Bizot H., (1976)- Methods for studying water vapor sorption and water activity of materials,. *In*, R. Walter (ed.), Biodeterioration investigation techniques. Barking Applied Science Publishers, New York. ppges. 149-183

N

Nambissam, Sundaressan (1985)- Effect of processing on the cyanoglucosides content of cassava. *Journal of Science of food and Agriculture* 36. 1199-1203

Nartey, F. (1968)- Studies on cassava *Manihot utilisima* Pohl. Cyanogenesis: The biosynthesis of linamarin and lautostraline in etiolated seedings *Phytochemistry*. 7, 1307-1312

Nartey, F., (1978)- Cassava cyanogenesis ultrastructure and seed germination. *In Cassava copenhagen muksgaard*. Eds.R.Denis, F.Walter New york.pp 234

Nartey, F. (1981)- Cyanogenesis in tropical feeds and foodstuff. *Phytochemistry*, 7,1307-1312

Nout, M., Rombout, F., Hautvast, G., (1989)- Accelerated natural lactic fermentation of infant food formulations. *Food Nutr. Bul.*, 11: 65-73.

O

Ofuya (C.), Najiorfor (C.) (1989) - Development and evaluation of starter culture for the industrial production of Gari. *J.Appl. Bacteriol.* 66:37- 42

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

Okafor, N., Ijioma, B., Oyolu, C., (1984) - Studies on the microbiology of Cassava retting for foo-foo production. *J;Appl. Bacteriol.*, 56:1-13

Okafor, N., (1977) - Microorganisms associated with cassava fermentation for “gari” production. *J. Appl. Bacteriol.* , 42, 279-284

Okafor, N., Ejiofor M., (1982) - Linamarase of *Leuconostoc mesenteroides* : Production, isolation and properties. *J. Appl.Sci. Food Agri.*, 36: 669-67

Okafor, N., Ejiofor, M., (1986)- The microbial breakdown of linamarin in fermenting pulp of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *MIRCEN J.*, 2 327-318.

Olukoya., D.K. (1995)- Screening of local isolate of *Lactobacillus* for characters useful in African food fermentations In Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon (D.) Trèche (S.) éd. :*Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris pp 345-352

Onyekwere O.O., Akinrele I.A. (1977) -« Nigerian Gari. In : *Symposium of indigenous fermented foods*, Bangkok, Thailand

Oyewole ,O.B., (1990)- Microbiological studies on cassava fermentation for « Lafun » and « fufu » production. Ph.D.Thesis. Dept.of Botany and Microbiology, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria

Oyewole O. B., Odunfa S.A. (1989)- Microbiological studies on cassava fermentation for « Lafun » production *Food Microbiology*, 5, 125-133

Oyewole O.B. (1992)- Cassava Processing In Africa *In: Application of Biotechnology to traditional fermented foods*. Report of an Ad-Hoc Panel of the Board on Science and Technology for international Development, USA, National Research Council: 89 - 92

Oyewole, O.B. (1995)- Application of biotechnology to cassava processing in Africa. *In* Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon (D.) Trèche (S.) éd. :*Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris pp. 277-286.

Oyewole, O.B., Odunfa (1992) Extracellular enzyme activities during cassava fermentation for « fufu » production. *World journal of microbiology and Biotechnology*, 8 :71-72

P

Perdigon G., Alvarez S., Nader e Macias, M., Roux M., Pesce de Ruiz Holgado A., (1990)- The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. *J. Food Protection*, 53, 404-410;

Poulton J.B., (1988).- Localisation and catabolism of cyanogenic glucosides. *In Cyanide Compounds in Biology* Ciba Foundation Symposium 140, 67-81

R

Rainbault, D. (1995)- Bactéries lactiques et fermentation du manioc *In* Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon (D.) Trèche (S.) éd. :*Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris pp. 258-275.

Reuser F., Spencer J.R.T. (1957) - The yeast Brewers. *Appl. Microbiol.* 6, 1-13

Richard J.E. (1985)- Tannins levels in cassava, a comparison of methods of analysis. *J. Sci. Food. Agric.* 37 :37-42

Roberts L.P. (1985) - Des protéines bactériennes pour la nutrition animale ; *Nature*, 165,494- 501.

Roblain D., Rikir R., Gilsoul J.J., Zgoulli S., Thonart P., (1995)- Séchage d'un *Lactobacillus plantarum*, *J.appl. Bacteriol*, 67 : 43-52

Rosling,A.R (1988)- Linamarine *Phytochemistry*, 24,13-20

S

Seigler D.S. (1975)- Isolation and characterization of naturally occurring cyanogenic compounds. *Phytochemistry*, 14, 9-29

Shaack M., Marth E., (1988)- Interaction between lactic acid bacteria and some food pathogens : a review. *Cultured Dairy Products J.*, 23 :14-17, 18-20

Sharp, M.E., Fryer T.F., Smith, D.G. (1966) - Identification of the lactic acid bacteria. *In* Identification Methods for Microbiologists, Part A, Eds B.M Gibbs, & F.A. Skinner, London & New York: Academic Press.

Spelhaug, S., Harlander, S. (1989)- Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *pediococcus pentosaceus*. *J. Food Protection*, 52:856-862

Starr, M.P., Chatterjee, A.K., Starr, P.B., Buchanan, G.E., (1977)- Enzymatic degradation of polygalacturonic acid by *Yersinia* and *Klebsiella* species in relation to clinical laboratory procedures. *J. Clin. Microbiol.*, 6 :379-386.

Svanberg U. (1991) a-« Lactic fermentation of cereal-based weaning gruels and improved nutritional quality ». *In Traditional African Foods- Quality and Nutrition*. IFS ed. : 53-60

Svanberg U. (1991) b-« The potential role of fermented cereal gruels in reduction of diarrhoea among young children ». *In : Traditional African Foods- Quality and Nutrition*. IFS ed. : 33-38

Svanberg U., Sjogren E., Lorri W., Svennerholm A.M., Kauser B. (1990)- Inhibited growth of common enteropathogenic bacteria in lactic fermented cereal gruels. *International Journal of food microbiology* 45 (5) 123-127

Svanberg U., Svanberg A., (1989)- Improved iron availability in weaning foods using germination and fermentation. *In :Nutrient availability : Chemical and biological aspects*. Ed. Southgate (D.), Johnson (D.) Fenwick (G.). *Royal society of Chem.*, Special Pub. 72 : 179-181.

Sylvestre M., Arreaudeau T., (1983)- le Manioc., Editions ORSTOM Paris 159p

T

Tinay El A.H, Bureng P.L., (1984)- Hydrocyanic levels in fermented cassava. *Journal of food Technology*, 19: 197-202

Trèche S., Legros O., Tchibindat F. (1995)- Vitafort : un atelier pilote de fabrication farine de sevrage à base de manioc au Congo *In* Agbor (E.),Brauman(A.), Griffon(D.), Trèche (S.) éd. :*Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris, pp 3-134.

Trèche S., Massamba J., (1995)- Les modes de transformation traditionnels du manioc au Congo .In Agbor Egbe (T.), Brauman(A.),Griffon (D),Treche (S.), éd.: *Transformation alimentaire du manioc*, Editions Orstom pp 453-460

Trèche S., (1995)- Importance du manioc en Alimentation humaine dans différentes régions du monde In Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon (D.), Trèche (S.) éd. :*Transformation Alimentaire du Manioc*. Orstom. Paris, pp 234-243

V

Vlanou L.M, (1985) -Enrichissement protéique du Manioc par les moisissures Editions ORSTOM. 136 pges

W

Werstey, T.D, (1979)- Biological stress of crops In *praised with Cassava* Ed. Westey D.,25(29), 22- 41.

Westby A., Twiddy D., (1992)- Role of micro-organismes in the reduction of cyanide during traditional processing of African cassava products In IFS Proceed. Workshop *Trad. African Foods, Quality and Nutrition*, 25-29 Nov. 1991, Ed. Westby et Reilly: 127- 131

Wood T. (1965)- The isolation properties and enzymatic breakdown of linamarin from cassava. *J. of the Sc. of Food and Agric.* 17, 85-90

Y

Yandju, D.L., (1989) - L'importance des moisissures dans le ramollissement du manioc en fermentation sèche. Mémoire de D.E.S. Fac.Sc. UNIKIS, Kisangani, Zaïre. 200pp.

ANNEXES

COMPOSITION DU MILIEU MRS

Peptone Bactériologique.....	10
Extraits de viande.....	5
Extraits de levures.....	5
Amidon soluble.....	10
Glucose.....	10
Hydrogenophosphate dipotassium.....	2
Hydrogenocitrate diammonium.....	2
Acétate de sodium.....	5
Sulfate de magnésium.....	0,1
Sulfate de manganèse.....	0,05
Tween 80.....	1
Agar.....	12
H ₂ O.....	Qsp1000ml.

COMPOSITION DU MILIEU PDA

Extraits de pommes.....	200
Agar.....	15
Dextrose (ou glucose).....	20

Cuire les pommes de terre dans environ un litre d'eau, puis filtrer et recueillir le jus.

Ajouter ensuite le Dextrose et l'Agar puis diluer par ébullition

COMPOSITION DU MILIEU SABOURAUD

Bio-Thione	3
Bio-Trypcase.....	3
Bio-Soyase.....	3
Extrait de levures	2
Extrait de malt.....	1
Amidon	19
Phosphate monopotassique.....	0,5
Phosphate disodique.....	0,5
Agar.....	13

COMPOSITION DU MILIEU A BASE DE PECTINE DE POMME

(pour recherche des microorganismes pectinolytiques.)

Pectine de pomme.....	7g
H ₂ O.....	500ml
Bleu de bromothymol.....	0,0001ml
Ajuster le pH à 7,5 avec du NaOH.	

PUBLICATIONS SEMINAIRES ET COLLOQUES

A ce jour, plusieurs travaux de la thèse ont été publiés dans des journaux nationaux ou internationaux et présentés au cours de plusieurs colloques internationaux:

- 1- Etoa F-X, **Djoulde Darman**, Essia N.J.J, Mbofung C.M.F (2004) :Screening des microorganismes à propriétés fermentaires pour le manioc, *Tropicultura*, sous presse.
- 2- **Djoulde Darman**, Etoa F-X, Essia N.J.J, Mbofung C.M.F (2004) Cassava fermentation by a mixt starter culture for cellulase Production, *Proceedings of the Sixth international scientific meeting of the Cassava Biotechnology Network*, 8-14 Mars 2004, CIAT Cali, Colombie.
- 3- **Djoulde Darman**, Etoa F-X, Essia N.J.J, Mbofung C.M.F (2004) The use of a starter culture to improve cassava fermentation, 12-16 septembre au congrès FOOD MICRO 2004, à Porto, en Slovénie,
- 4- **Djoulde Darman**, Etoa F-X, Essia N.J.J, Mbofung C.M.F(2003) Cassava fermentation with a mix starter culture of *Lactobacillus plantarum* and *Rhizopus oryzae*. Revue africaine de Microbiologie et d'Hygiène Alimentaire, (2003) 15, N°44 pp9-14
- 5- **Djoulde Darman** (2003) *Mise au point d'un ferment mixte destiné à la bioconversion des tubercules de manioc cyanogène* 3^{eme} Prix International « ANLP Young Investigator 2003» attribué par le comité scientifique de l'ANLP (African Nutrition Leadership Program) Novembre 2003 à Potschefstroom, en Afrique du sud,.
- 6- **Djoulde Darman Roger**, Essia Ngang Jean Justin, Etoa François-Xavier (2000) Amélioration du Rouissage du manioc , Biosciences Proceeding 2000 Vol 7