

# FERMENTATION DU MANIOC CYANOGENE PAR UNE CULTURE MIXTE DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ET *RHIZOPUS ORYZAE*

DJOULDE DARMAN Roger<sup>1\*</sup>, ETOA Francois-Xavier<sup>2</sup>, ESSIA NGANG Jean-Justin<sup>2</sup>, MBOFUNG Carl .M.F<sup>3</sup>

1- Institut de Recherche Agricole pour le Développement, B.P: 33 Maroua-Cameroun Tel: (237) 986-17-64, E-mail: [djouledarman@yahoo.fr](mailto:djouledarman@yahoo.fr)

\*Auteur à qui toute correspondance devrait être adressée

2 -Département de Biochimie, Université de Yaoundé. B.P:1457, Yaoundé- Cameroun Tel: (237)966-97-55, E-mail: [fxetoa@yahoo.fr](mailto:fxetoa@yahoo.fr)

3. Department of Food Sciences and Nutrition, National Advanced School of Agro-Process Industries, University of Ngaoundéré P.O Box: 455 Ngaoundéré Cameroon. Tel: (237)984-16-54, E-mail: [cmbofung@yahoo.fr](mailto:cmbofung@yahoo.fr)

## Resumé:

Afin de permettre un meilleur contrôle du rouissage naturel, et d'assurer une meilleure qualité des produits de transformation du manioc, deux souches microbiennes dont *Lactobacillus plantarum* et *Rhizopus oryzae*, ont été testées comme ferment sur du manioc amer de variété TMS 3001. L'utilisation de ce starter composé de  $10^9$  cellules/gMS de *Lactobacillus plantarum*, et  $10^7$  cellules/gMS de spores *Rhizopus oryzae*, a permis de réduire : la durée du rouissage de cinq jours à 40 heures, le taux de glucosides cyanogénétiques de 95%, et d'améliorer la qualité microbiologique du manioc rouis en éliminant le développement des germes pathogènes.

*Mots clés* : Manioc, starter, Glucosides cyanogénétiques, amylases, Rouissage

## Abstract

The mass inoculation of cassava tubers with a mix starter culture of *Lactobacillus plantarum* ( $10^9$  cells/gDM) and *Rhizopus oryzae* ( $10^7$  cellules/gDM) has permit a better control of fermentation, by reducing the duration time of retting for 5 days to 40 hours, and 95% of the total cyanid content. This yield to an improved cassava quality product .

*Keywords*: Cassava, starter, cyanogens, amylases, retting

## INTRODUCTION

Les processus de transformation du manioc pour l'alimentation traditionnelle sont très variés. Comme cette plante se cultive dans toute la zone tropicale depuis très longtemps, des techniques se sont développées et ont donné lieu à des produits très différents selon la zone considérée. Ces nombreux produits mis au point par l'expérience accumulée par les populations, qui tiennent compte des objectifs alimentaires, sociaux, économiques et culturels, ont souvent pour préoccupations essentielles, la conservation d'une denrée périssable et l'élimination de la toxicité liée à la présence de glucosides cyanogénétiques. Pour atteindre ces deux principaux objectifs, les pratiques traditionnelles ont abouti à plusieurs procédés dont la fermentation par action des bactéries lactiques, composante que l'on retrouve quasiment dans tous les procédés de transformation traditionnelle du manioc (Oyewolé, 1992). Malheureusement, ce processus fermentaire qui s'effectue spontanément grâce au développement de la microflore épiphyte (Giraud *et al.*, 1995), peut conduire à des produits d'une qualité organoleptique, microbiologique ou toxicologique indésirable (Trèche *et al.*, 1995). L'inoculation du manioc avec un starter de microorganismes à multiples potentialités, permettrait d'assurer la maîtrise de l'étape de fermentation et ainsi réduire voir éliminer les contraintes associés a la production des dérivés du manioc de qualité. L'objectif de ce travail est l'utilisation d'un starter composé de deux microorganismes sélectionnés de la nature, dans le but d'améliorer les qualités toxicologiques, nutritionnelles, et microbiologiques du manioc pendant le rouissage.

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Origine des souches

Les souches de microorganismes à multiples potentialités enzymatiques (producteurs d'enzymes tel les amylases, la  $\beta$ -glucosidase, les pectinases) composant le starter ont été isolés de la nature suivant les méthodes décrites par Olukoya (1995).

### 2. Préparation et utilisation du starter

Les microorganismes utilisés pour la préparation de notre starter sont des souches de *Lactobacillus plantarum*, et de *Rhizopus oryzae*; toutes à activité amylolytique, linamarase et, pectinase importantes. Le rouissage est effectué par ensemencement des tubercules de manioc par une culture mixte de *Lactobacillus plantarum* contenant  $10^9$  cellules/ millilitre, et de *Rhizopus oryzae* contenant  $10^7$  spores / millilitre.

### 3.Méthodologie

Après prélèvements aux champs, les racines de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) de variétés amères fournies par le centre I.R.A.D de Ngaoundéré, non altérées sont lavées, épluchées, puis découpées. Des lots de 250 g sont réalisés. Un premier lot est immergé dans de l'eau de pluie ou de puits, dans un erlen de 1 L, et sert de témoins de rouissage naturel au laboratoire. Un second lot est immergé dans de l'eau puis inoculée par le starter avant d'être incubé avec le premier lot, à température du laboratoire, et sert de témoins de rouissage avec le Starter. Parallèlement des prélèvements sont effectués chez une ménagère qui réalise une fermentation en puits dans un trou creusé à même le sol, remplis d'eau, par immersion des tubercules. Ceci constitue le témoin de fermentation

naturel traditionnel. Des portions de tubercules et d'eau de rouissage sont alors prélevées toutes les 24 heures dans tous les témoins pour analyses biochimiques et microbiologiques

#### 4.Méthodes analytiques.

**Le pH :** la détermination du pH est effectuée sur de racines prélevées toutes les 24 heures de manière aléatoire dans les échantillons témoins (pH mètre p 307 consort)

**Indice de pénétrométrie :** Le protocole utilisé pour suivre le ramollissement des racines est l'indice de penentrometrie (Ampe *et al.*, 1994).

**Protéines totales :** Les Protéines totales sont évaluées par la méthode modifiée de Hantzsch (DEVANI *et al.*, 1989) sur des échantillons de tubercules prélevés de manière aléatoire en fin de rouissage.

**Détermination de la concentration en cyanures totaux résiduels :** Les cyanures totaux seront déterminées suivant la méthode enzymatique d'Ikediobi *et al.*(1981), sur des échantillons de tubercules prélevés de manière aléatoire en fin de rouissage.

**Numération de la microflore :** 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, SABOURAUD au chloramphénicol pour la flore fongique totale, et TSN(Trypcase-Soy-Néomycine) pour les Sulfito réducteurs.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS.

### Caractéristiques des souches du Starter

L'isolement, fait par screening avec pour base la production des enzymes  $\alpha$ -amylases,  $\beta$ -glucosidases, polygalacturonase, et la résistance aux fortes teneurs en composées cyanés, nous a permis de retenir les souches

dont les caractéristiques sont indiquées dans le tableau1, pour notre Starter. Le bagage enzymatique de ces souches sera mis à contribution pour l'amélioration des qualités toxicologique et nutritive du manioc. En effet, la linamarase( $\beta$ -glucosidase) contribuerait à dégrader la linamarine, principal responsable de la toxicité du manioc; l' $\alpha$ -amylase servirait à dégrader l'amidon du manioc en sucres fermentescibles, et, fournir le substrat de fermentation à la microflore toute entière. La pectineméthylesterase, contribuerait au ramollissement en attaquant la pectine principale, squelette rigide des cellules du manioc.

Tableau 1 : Caractéristiques des souches du starter

Origine	Pulpe de manioc en fermentation	Pulpe en fermentation et pelures
Milieu d'isolement	M.R.S*	PDA*
Morphologie	Bacilles gram +	Filaments, et Blastospores
Catalase	-	+
$\alpha$ -amylase	+	-
$\beta$ -glucosidase	+	+
Pectine méthylesterase	-	+
Bactériocine	+	nd
Orientation	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>

\*= Modifiés par ajout de 10g d'amidon, du K.C.N à 0,25% et, 2g du citrate de fer ammoniacal plus 1g d'esculine pour un litre du milieu.  
nd= non déterminé

### Potentiel d'hydrogène

On note une baisse plus accentuée du pH lors du rouissage avec le starter comparativement aux rouissages naturels (Fig 1). Ceci pourrait être dû à une introduction massive des lactobacilles du starter dont l'activité de synthèse des acides organiques contribue à accentuer le pH. Ceci pourrait être bénéfique dans le sens de l'amélioration de la qualité hygiénique des dérivés du manioc, et même augmenter leur durée de conservation. En fait les bactéries lactiques introduites ici en grande quantité, produiraient l'acide lactique, et peut être dans certains cas, l'acide acétique (Giraud *et al.*, 1991), ceci limiterait considérablement le développement des microorganismes indésirables ou pathogènes par leurs propriétés antiseptiques reconnues, 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, ce qui est le cas ici s'agissant de la fermentation avec notre Starter (Fig 1). On constate par contre une diminution du pH limitée dans le cas de la fermentation naturelle par la ménagère, ceci pourrait s'expliquer par les conditions dans lesquelles se déroulent la fermentation (température, accessibilité du substrat, effet tampon du milieu) non contrôlée.

### Ramolissement.

Le ramollissement ici est plus rapide dans le cas du rouissage avec le starter (Fig2) comparativement aux rouissages naturels. Cette accélération du ramollissement pourrait être due à la présence dans le starter des microorganismes capables de produire la pectineméthylesterase (Tableau 1), qui est une enzyme qui contribue à la dégradation des pectines, par ailleurs, constituants majeurs de la paroi cellulaire, et responsables de la rigidité de la pulpe du manioc. Ampe *et al.*, (1995) ont indiqué que le ramollissement du manioc ne serait pas seulement le fait du stress physique, mais surtout de l'activité des enzymes pectolytiques, dont la pectineméthylesterase et les polygalacturonases.

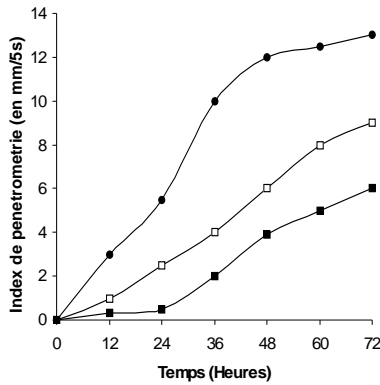


Fig 2 Evolution du ramollissement au cours du Rouissage naturel au labo(□) du rouissage naturel d'une ménagère (■) et du rouissage avec le starter (●)

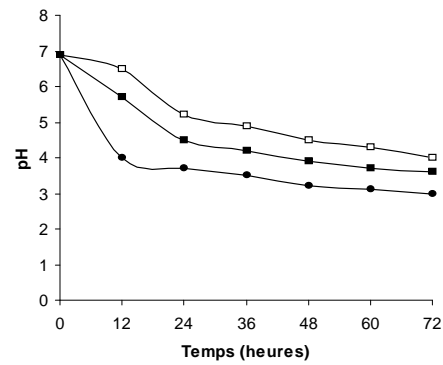


Fig 1 Evolution du pH au cours du Rouissage naturel au labo(□) du rouissage naturel d'une ménagère (■) et du rouissage avec le starter (●)

### Les cyanures et les protéines totaux.

les dosages effectués en fin de fermentation, après 48 heures, nous ont permis de constater qu'au cours de la fermentation par le starter, les glucosides totaux sont réduits de près de 95±4%, comparativement aux rouissages naturels où on observe des taux d'élimination de moins de 50% (Fig 3). 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. 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, et Okafor (1984) a par ailleurs, isolé plusieurs bactéries capables de dégrader la linamarine. La microflore exogène pourrait donc contribuer à améliorer l'élimination des cyanures présents dans le manioc. La forte diminution observée au cours du rouissage avec notre starter, pourrait donc être liée à une activité linamarase exogène (des microorganismes du starter) intense. 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.

Les protéines totales, par contre, sont augmentées de 10±2 % avec le starter alors que l'on n'observe pas de différence entre les taux de protéines dans le manioc frais, comparativement au manioc roui de manière naturelle (Fig4). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nous avons introduit massivement les levures et les moisissures par le biais du starter, ces champignons étant tous amylolytiques (Tableau 1), 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 starter, les champignons par leurs corps protéiques étant une source de protéines de qualité (Yandju, 1989). Cette incrimination de l'augmentation des protéines totales aux Champignons est d'autant plus confortée que l'on observe une biomasse assez importante au cours de la fermentation par le starter avec des taux de  $7,5 \cdot 10^7$  cellules /gMS après 48 heures de rouissage seulement (Fig 5).

### Les protéines totales.

Les protéines totales par contre, sont augmentées de 10±2 % avec le starter alors que l'on n'observe pas de différence entre les taux de protéines dans le manioc frais, comparativement au manioc roui de manière naturelle (Fig4). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nous avons introduit massivement les levures et les moisissures par le biais du starter, ces champignons étant tous amylolytiques (Tableau 1), 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 starter, les champignons par leurs corps protéiques étant une source de protéines de qualité (Yandju, 1989). Cette incrimination de l'augmentation des protéines totales aux Champignons est d'autant plus confortée que l'on observe une biomasse assez importante au cours de la fermentation par le starter avec des taux de  $7,5 \cdot 10^7$  cellules /gMS après 48 heures de rouissage seulement (Fig 5).

### Les pathogènes.

On remarque une nette diminution des coliformes et des clostridiens au cours du rouissage avec le Starter comparativement aux rouissages naturels (Fig 6 et 7). Ceci pourrait s'expliquer par l'activité des bactéries lactiques que nous avons massivement introduits 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

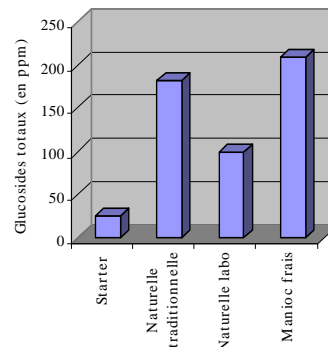


Fig 3: Distribution des Glucosides résiduels totaux après 48 heures de rouissage

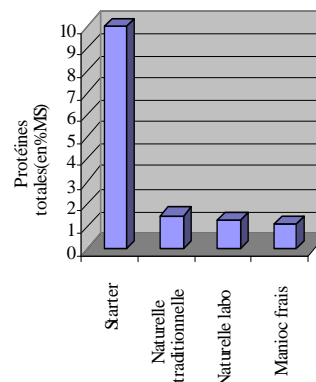


Fig 4: Distribution des protéines totales après 48 heures de rouissage

dans les cellules bactériennes où ils s'ionisent et s'accumulent, provoquant un abaissement interne du pH et le blocage de mécanismes de transport. L'action des bactéries lactiques dans l'inhibition des pathogènes est confortée ici par le fait que la bactérie lactique qui fait partie de notre starter, comme toutes les bactéries lactiques, ne possède pas de catalase (Tableau 1). En présence de l'air, leur métabolisme conduit à une accumulation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), autre antiseptique puissant contre les germes pathogènes intestinaux. Svangberg *et al.* (1990, 1991a et 1991b) ont réalisés des études spécifiques concernant l'effet de la fermentation lactique sur la diminution de *Salmonella typhymurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Shigella disenteriae*, et les implications sur l'état des populations d'enfants alimentés avec des produits amylicés 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. Enfin, des études ont montré que la bactérie lactique de notre starter est capable de synthétiser des bactériocines (Tableau 1). Ces bactériocines, notamment la nisine, serait active contre certaines bactéries Gram négatives, parmi lesquelles on rencontre des entérobactéries et germes pathogènes (Nout *et al.*, 1989; Perdigon *et al.*, 1998; Shaack *et al.*, 1988 et Spelhaug *et al.*, 1989)

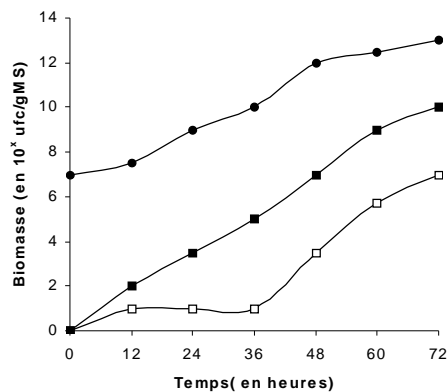


Fig 5 Evolution de la flore fongique totale au cours du Rouissage naturel au labo(?) du rouissage naturel d'une ménagère (◻) et du rouissage avec le starter (●)

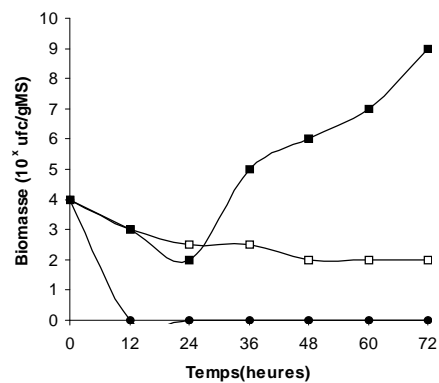


Fig 6 Evolution des entérobactéries totales au cours du Rouissage naturel au labo(?) du rouissage naturel d'une ménagère (◻) et du rouissage avec le starter (●)

## CONCLUSION

L'utilisation du starter composé de *Lactobacillus plantarum* et *Rhizopus oryzae*, a permis d'avoir un ramollissement plus rapide, un meilleur rendement de détoxification, un gain en protéines non négligeable, et une meilleure qualité hygiénique des produits dérivés du manioc. Ces résultats cependant devraient faire l'objet d'une évaluation à une échelle plus grande (unité pilotes) avant d'être vulgarisées.

## REFERENCES

- 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
- Giraud, E., Brauman, A., Kéléké, S., Gosselin L., Raimbault M., (1995). Contrôle de la fermentation du manioc pour un meilleur gari : Utilisation d'un starter de *Lactobacillus plantarum* à activité linamarase et amylase, In *Transforamtion alimentaire du Maanioc*. Ed Agbor E., Brauman A., Griffon D., Trèche S., Orstom.Paris.
- Trèche, S., Lagro, O., Tchibinda F., (1995) Vitafor: un atelier pilote de fabrication de farine de sevrage à base de manioc au Congo. In *Transforamtion alimentaire du Maanioc*. Ed Agbor E., Brauman A., Griffon D., Trèche S., Orstom.Paris.
- Olukoya D.K. (1995) Screening of local isolate of *Lactobacillus* for character useful in African Food fermentations . In *Transforamtion alimentaire du Maanioc*. Ed Agbor E., Brauman A., Griffon D., Trèche S., Orstom.Paris
- 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.
- Devani, M.B., Shishoo, Shah, S.A. Suhagia B.N., (1989) Spectrophotometric for the microdetermination of nitrogen in Kjeldhal digest. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* Vol 72 (6) 953-956.
- Ikediodi, C.O., Ogundu E., Ukoa, A., 1985-Production of linamarase by *Aspergillus sydowi* and *Fusarium equiseti*. *Process Biochem.*, 20: 99-102
- Buttiaux ,R., Beerens, H., Taquet, A., (1974) Manuel de techniques bacteriologiques, 4<sup>ème</sup> ed. Flammarion, Paris, 70p

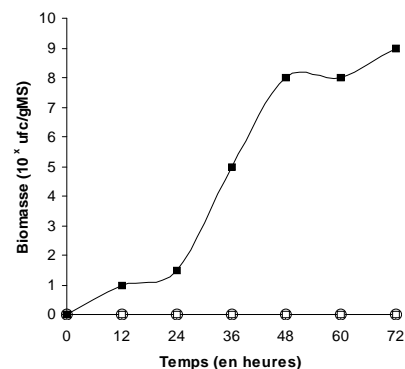


Fig 7 Evolution des sulfito-réducteurs totaux au cours du Rouissage naturel au labo(?) du rouissage naturel d'une ménagère (◻) et du rouissage avec le starter (●)

- Ampe F., Brauman,A., (1995)-Enzymatic origin of detoxification and root softening in cassava. *World. J. of Microbiol.Biotechnology.*, in press.
- Ikédiobi,C.O., Onyia,G.O.C., Eluwa C.E.,(1980) A rapid and inexpensive assay for total Cyanid in Cassava (*Mnivot esculenta* Crantz) and cassava Products, *Agr.biol.chem.*, 44,2803-2809
- 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.
- Svangbert U., Svanberg A.(1989) Improved iron availability in weaning foods using germination and fermentation. In Nutrien availability: chemical and biological aspect. Eds. Southgate (D.), Johnson,D., Fenwick,G., Royal society of Cheml., Spetial Pub.N° 72: 179-181
- Svangbert U (1991a)-lactic fermentation of cereal-based weaning gruels and improved nutritional quality, *In traditional African Foods Quality and Nutrition*. IFS ed. 53-60.
- Svangbert U( 1991b) 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
- Nout (M.), Rombout (F.), Hautvast (G.), 1989- Accelerated natural lactic fermentation of infant food formulations. *Food Nutr. Bul.*, 11: 65-73.
- Perdigon *et al.*, 1998;
- Shaack,M., Marth,E., (1988)-Interaction between lactic acid bacteria and some food pathogens: a review. *Cultured Dairy Products Journal*, 23 :14-20
- 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