



**UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE / SCIENCES
DE LA VIE ET DE LA TERRE**

**CENTRE DE RECHERCHE EN SCIENCES BIOLOGIQUES
ALIMENTAIRES ET NUTRITIONNELLES**

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

Sur le thème

LES ALIMENTS FERMENTES D'AFRIQUE CENTRALE : CAS DU CONGO

Présentée par :

Simon Charles KOBAWILA

Docteur

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR ES SCIENCES BIOLOGIQUES

Soutenue le 29 mars 2003

Devant le jury

Président : Alfred S. TRAORE, Professeur Titulaire, Université de Ouagadougou
Membres : Thomas SILOU, Professeur Titulaire, Université Marien Ngouabi
Delphin LOUEMBE, Maître de Conférences, Université Marien Ngouabi
Joseph D. HOUNHOUGAN, Maître de Conférences, Université Abomey-Calavi
Aboubacar S. OUATTARA, Maître de Conférences, Université de Ouagadougou

Année académique 2002-2003

A la mémoire de mes parents, Simon
et Anne Emilie, et de mon fils Sydney,
A mon épouse Jacqueline,
A mes enfants Nehl, Nancy, Christian et Anna,
A mes frères et sœurs, Colette, Georges,
Abraham, Salomon et Victorine
A toute ma famille,
A tous mes amis,
J'offre l'achèvement de ce travail en témoignage
de mon affection et de ma gratitude pour
l'amour, les douleurs et sacrifices consentis.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans plusieurs laboratoires, à la Faculté des Sciences de l'Université Marien NGOUABI (Brazzaville), au niveau de l'EPRAN (Equipe Pluridisciplinaire de Recherche en Alimentation et Nutrition) et du CRSBAN (Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles) de l'Université de Ouagadougou.

Qu'il me soit permis de remercier :

- le Professeur Alfred S. TRAORE, Professeur Titulaire et Directeur du CRSBAN pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir co-dirigé ce travail. En le faisant, vous manifestez un grand intérêt pour l'étude réalisée et pour la formation des scientifiques africains de haut niveau et la coopération sud-sud. Je vous témoigne toute ma gratitude.
- le Professeur Thomas SILOU, Professeur Titulaire et Directeur de EPRAN, pour m'avoir accepté dans EPRAN et pour sa collaboration et son apport fort enrichissant dans la réalisation de ce travail ainsi que pour sa participation au jury. Vous avez ainsi contribué à l'amélioration du potentiel scientifique congolais de haut niveau. Je vous exprime toute ma reconnaissance.
- le Professeur Delphin LOUEMBE, Maître de Conférences et sous-Directeur de EPRAN, pour avoir co-dirigé ce travail et m'avoir guidé dans l'accomplissement dudit travail, pour sa disponibilité sans faille et la rigueur scientifique. Je vous en suis gré.
- les Docteurs Joachim MASSAMBA et Simon KELEKE et les chercheurs de EPRAN et les enseignants du CRSBAN (Ouagadougou), le Professeur Aboubacar S. OUATTARA et le Docteur Cheik T. OUATTARA, du Département de Biologie cellulaire

et Moléculaire (Brazzaville) pour leur disponibilité , leurs conseils fructueux et leur contribution dans ce travail.

- l'IRD, l'UNESCO et la FIS pour leur soutien multiforme et la mise à disposition des moyens permettant la réalisation de ce travail.

Nos remerciements vont également à tous ceux qui dans la discrétion et l'anonymat ont contribué à la réalisation de ce document.

CURRICULUM VITAE

Nom : **KOBAWILA**
Prénoms : **Simon Charles**
Date et lieu de naissance : 13 janvier 1949 à Kinshasa
Nationalité : Congolaise

DIPLOMES OBTENUS

Certificat d'Etudes Primaires (Kinshasa, 1961)
B.E.P.C. (Brazzaville, 1965)
Baccalauréat D (Brazzaville, 1968)
DUES Chimie-Biologie (Brazzaville, 1971)
Licence Biochimie (Orléans, 1972)
Maîtrise Biochimie (Orléans, 1974)
DEA Biochimie (Nancy, 1975)
Doctorat 3^e cycle Biochimie (Nancy, 1977)

FONCTIONS ET ACTIVITES CIVILES

Maître-assistant de Biochimie (1977)
Chef de Département (1983 – 1991)
Conseiller spécial Ministère des Mines et Energie (1992)
Consultant à l'Enseignement Supérieur Ministère de
l'Education Nationale (1993)
Secrétaire Général Adjoint du Syndicat National de
l'Université (SYNALU) (1991 –2000)

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	8
Chapitre 1 – Revue bibliographique.....	11
1. Les fermentations.....	12
1.1 Les types de fermentation.....	15
1.2 Utilité des fermentations.....	25
2. Aliments fermentés du Congo.....	33
2.1 Vin de palme « nsamba ».....	33
2.2 Pâte fermentée de maïs « poto-poto ».....	34
2.3 Tubercules rouis « bikedi » et feuilles fermentées « ntoba mbodi » de manioc.....	35
Chapitre 2 – Protocole expérimental.....	42
1. Méthodologie.....	43
2. Les procédés de production d'aliments fermentés.....	48
Chapitre 3 – Résultats.....	53
1. Microflore caractéristique adaptée et sélectionnée selon les conditions de l'environnement.....	54
1.1 Tubercules rouis « kikedi ».....	54
1.2 Vin de palme « nsamba ».....	60
1.3 Pâte fermentée de maïs « poto-poto ».....	62
1.4 Feuilles fermentées de manioc « ntoba mbodi »...	65
2. Souplesse du métabolisme et diversité de composés produits.....	70
2.1 Vin de palme « nsamba ».....	70
2.2 Tubercules rouis de manioc « bikedi ».....	72
2.3 Pâte fermentée de maïs « poto-poto ».....	75
2.4 Feuilles fermentées de manioc « ntoba mbodi »....	80

3. Changements physicochimiques de texture, de couleur et de réfraction.....	86
3.1 Changements de texture : ramollissement.....	86
3.2 Changements de couleur : brunissement.....	90
3.3 Changement d'indice de réfraction.....	91
4. Détoxification du produit.....	93
4.1 Tubercules rouis de manioc « bikedi ».....	93
4.2 Feuilles fermentées de manioc « ntoba mbodi ».....	94
Chapitre 4 – Discussion – Conclusion générale – Bibliographie.....	96
1. Aspects physicochimiques, biochimiques et Microbiologiques.....	97
1.1 Vin de palme « nsamba ».....	97
1.2 Pâte fermentée de maïs « poto-poto ».....	99
1.3 Tubercules rouis de manioc « bikedi ».....	101
1.4 Feuilles fermentées de manioc.....	105
2. Aspects fondamentaux des travaux.....	110
2.1 Diversité de composés produits et types de fermentation.....	110
2.2 Microflore adaptée à l'environnement.....	111
2.3 Changement de texture et de couleur.....	114
2.4 Détoxification du produit.....	116
2.5 Relations entre ramollissement, croissance Microbienne et détoxification.....	119
Conclusion générale.....	122
Bibliographie.....	124
Annexe – Publications.....	145

AVANT – PROPOS

Cette thèse de Doctorat d'Etat de l'Université de Ouagadougou, est une thèse sur publications. Elle est rédigée sur la base desdites publications complétées ou actualisées par des données nouvelles. Une introduction générale initie un fil conducteur permettant de relier les différentes publications et conduisant à la conclusion générale.

INTRODUCTION

Les microorganismes, au départ, se sont révélés à l'homme surtout comme des pires ennemis. Mais, à leur découverte, beaucoup se sont présentés soit comme des acteurs principaux de la conversion de la matière organique en composés minéraux simples assimilables par les autres formes de vie soit comme des auxiliaires indispensables à l'homme par les possibilités illimitées que l'on peut tirer de leur métabolisme.

Ainsi, l'homme a appris par son savoir faire à travers les siècles à utiliser les microorganismes (levures, moisissures, bactéries) pour produire par fermentation des saveurs, des arômes, des aliments, des boissons, des médicaments et des produits chimiques.

Dans le cadre de la problématique alimentaire du Congo, notre activité de recherche a été réorientée en biotechnologie pour tenter d'améliorer la qualité des aliments traditionnels fermentés. Au Congo, depuis des temps immémoriaux, un savoir faire artisanal a permis d'exploiter sans connaissances scientifiques les potentialités des procédés de fermentations pour produire des aliments et boissons fermentés. Ces procédés constituent des voies de valorisation de ressources agricoles.

Divers aliments fermentés indigènes du Congo ont été caractérisés et leurs technologies, transmises de génération en génération de mères en filles, sont maîtrisées par les femmes. Ces aliments comprennent entre autres des racines, des feuilles, des graines, des fruits, etc.

La pulpe ou la baie d'un fruit et les feuilles de certaines plantes peuvent être mises à fermenter pour donner des légumes fermentés. C'est le cas de *Landolphia jumelei* ou *tsiya*, (pulpe fermentée d'une baie) et du *ntoba mbodi* (feuilles fermentées du manioc). En ce qui concerne les racines, notamment les tubercules de manioc, c'est la pulpe qui est fermentée

puis transformée pour donner un aliment glucidique de base chez les congolais, le *fufu* (masse empesée et gélifiée de la farine de manioc) et la *chikwangué* (masse cuite de pâte fermentée de manioc).

Quant aux feuilles, ce sont surtout les feuilles de manioc qui sont fermentées pour donner un légume fermenté très prisé dans certaines contrées du Congo. L'étude de ces aliments fermentés indigènes devrait permettre d'améliorer la qualité et d'optimiser la production desdits aliments.

Les boissons traditionnelles fermentées sont produites selon les procédés traditionnels généralement dans les zones où sont cultivées les matières premières végétales, par exemple le palmier à huile, les agrumes, l'ananas et la canne à sucre. La technique de fermentation consiste à laisser tourner le jus extrait de certains fruits ou la sève du palmier à huile afin de produire de l'alcool. Il s'effectue une fermentation spontanée grâce à la présence de la microflore issue de la matière végétale. Les vins de certains types de fruit sont très appréciés des congolais mais la période de production correspond à la saison de maturité du fruit. On peut citer les vins d'orange, de pamplemousse, d'ananas, de palme, etc... Comme autres boissons alcoolisées, il y a le *boganda*, qui résulte de la fermentation d'un mélange aqueux de la farine de malt de maïs avec la farine de manioc empesée. Le liquide fermenté est par la suite distillé.

Ces aliments et boissons fermentés traditionnels occupent une place de choix dans l'alimentation des congolais. Le vin de palme est utilisé dans toutes les cérémonies traditionnelles de la société congolaise. L'apport énergétique est assuré par le *fufu* ou la *chikwangué*. Le pain, naguère un produit de luxe et de promotion sociale, s'est aujourd'hui introduit dans les habitudes alimentaires des congolais. Ce phénomène s'accroît avec la pauvreté qui galope. Le lait fermenté, notamment le yaourt, est le

produit laitier le plus répandu. Très prisé en raison de son caractère nourrissant et rafraîchissant et de son coût modéré, il est fabriqué dans des petites unités industrielles et artisanales.

CHAPITRE 1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES FERMENTATIONS

Selon les théories sur l'histoire de la terre, les premières cellules vivantes apparues il y a environ $3,5 \times 10^9$ d'années dans un environnement dépourvu d'oxygène mais riche en molécules organiques d'origine géochimique, ont dû utiliser des voies métaboliques productrices d'ATP les plus primitives qui ressemblaient vraisemblablement aux formes actuelles de fermentation (1).

La fermentation est une oxydation biologique au cours de laquelle l'accepteur final d'hydrogène est un composé organique. Cet accepteur final peut être un produit de dégradation du substrat oxydable ou une autre substance organique présente dans le milieu. Le substrat oxydable peut aussi jouer ce double rôle, à la fois source de carbone et accepteur d'électrons libérés.

Louis PASTEUR a reconnu en 1860 que la fermentation n'était pas un processus spontané mais le résultat de vie en absence d'air (2). Il a réalisé que des levures décomposent beaucoup plus de sucres en anaérobiose qu'en aérobiose et que la fermentation anaérobie était essentielle à la vie de ces organismes (2). Actuellement, le mot fermentation est employé indistinctement pour des cultures microbiennes en présence ou en absence d'oxygène. Une double définition de la fermentation peut être donnée.

a) La fermentation est l'ensemble de processus de transformations d'oxydo-réduction conduisant, à partir d'un substrat organique, à un métabolite particulier avec production d'énergie sans transport d'électrons. Selon la nature du métabolite synthétisé par le micro-organisme, on parle de fermentation alcoolique, lactique, acétique, etc.

b) La fermentation d'un point de vue technologique se définit comme l'ensemble des opérations qui permettent de cultiver les micro-organismes et de contrôler leurs activités biosynthétiques : synthèse de biomasse, d'enzymes ou de molécules organiques diverses.

Certains micro-organismes en anaérobiose pour survivre tirent leur énergie de la transformation des glucides en alcool, dioxyde de carbone et en acides organiques en substituant leur processus de respiration (aérobie) par un autre qui est la fermentation.

Au cours de la fermentation des glucides, ce sont les réactions de réduction du pyruvate qui différencient les bactéries fermentaires. Elles conduisent à des produits finaux divers soit uniques soit en mélange : éthanol, lactate, propionate, formiate, butyrate, succinate, caproate, acétate, n-butanol, 2-3 butanediol, acétone, 2-propanol, CO₂, H₂. Selon l'importance de ce produit final, on parlera de fermentation alcoolique, acétique, lactique, propionique, etc...

Il y a donc plusieurs types de fermentations.

1.1 LES TYPES DE FERMENTATIONS

1.1.1 La fermentation alcoolique

Le catabolisme des sucres simples en anaérobiose avec production finale d'éthanol et de dioxyde de carbone constitue la fermentation alcoolique (2) (3). La fermentation alcoolique est très répandue chez les levures, *Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Brettanomyces* etc. Peu de bactéries (*Zymomonas mobilis*, *Zymomonas lindnerie*, *Zyмосarcina ventriculi*,...) réalisent la fermentation.

Dans la fermentation alcoolique par la levure, le cycle métabolique débute par la glycolyse ou voie d'Embden- Meyerhof- Parnass. C'est ensuite l'acétaldéhyde, produit de la décarboxylation du pyruvate, qui est l'accepteur d'électrons. La réduction de l'acétaldéhyde est assurée par l'alcool déshydrogénase en présence de NADH_2 .

Le NADH produit dans l'étape de l'oxydation est reoxydé dans une réaction par laquelle le substrat est réduit en produit final. Le NAD alterne entre les formes oxydées et réduites.

Ce couplage strict des étapes d'oxydation et de réduction est caractéristique de toutes les fermentations anaérobies. La formation d'ATP à partir d'ADP et P_i par phosphorylation au niveau du substrat est commune à toutes les fermentations.

Les souches de levures assurant la fermentation alcoolique tolèrent des concentrations élevées d'éthanol, plus de 15% (v/v), que supportent peu de micro-organismes. Toutefois, cette tolérance varie d'une souche à l'autre.

Une variation de la fermentation alcoolique a lieu lorsque la levure est en croissance en milieu alcalin. Dans ces conditions, l'acétaldéhyde est oxydé en acide acétique par une déshydrogénase NAD⁺ dépendante.

Le NADH formé dans cette étape est utilisé pour réduire une quantité équivalente d'acétaldéhyde en éthanol. En même temps, le NADH produit dans l'oxydation initiale du triose-P est utilisé pour réduire la moitié du triose-P formé en glycérol-P



La réaction sous cette forme est probablement avantageuse pour la cellule parce que l'acide acétique produit tend à neutraliser les alcali. Le pH du milieu revient à la neutralité.

Certaines fermentations peuvent être dérivées du cycle de l'acide tricarboxylique ou du shunt glyoxylique. *Escherichia coli*, *Pseudomonas* et de nombreuses espèces de moisissures sont impliquées dans ces fermentations.

1.1.2 La fermentation lactique

On peut distinguer dans ce groupe deux types de fermentations dans lesquels l'acide lactique est le produit unique ou dominant. La fermentation homolactique est une voie métabolique produisant de l'acide lactique, comme seul produit final. La fermentation est dite hétérolactique quand il y a une forte production d'acide lactique, d'acide acétique, d'éthanol et de dioxyde de carbone (2) (3).

La fermentation homolactique est réalisée par les bactéries homolactiques comme *Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus* et *Pediococcus*

damnosus. Quelques bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*, notamment *Lactobacillus coprophilus*, *L. fermentatum*, etc... et *Leuconostoc mesenteroides* accomplissent la fermentation hétérolactique par la voie des pentoses-phosphates, car ces bactéries manquent les enzymes clé de la fermentation homolactique, la fructose-1,6-diphosphate aldolase et la triose-phosphate isomérase.

La dégradation du glucose se fait par la voie de la phosphocétolase. Le glucose est converti en ribulose-5-phosphate formé à partir du 6-phosphogluconate, en utilisant des réactions de la voie des pentoses-phosphates. L'épimérisation du ribulose-5-phosphate donne le xylose-5-phosphate qui est scindé par la phosphocétolase en glycéraldéhyde-3-P et en acétyl-P.

Le glycéraldéhyde-3-P formé est converti en acide lactique et l'acétyl-P en éthanol. La production globale d'énergie est seulement d'un ATP par glucose fermenté. Le rendement énergétique dans une fermentation hétérolactique est deux fois plus faible que dans une fermentation homolactique.

Une simple modification permet une fermentation des pentoses en acides acétique et lactique avec production d'un ATP via l'acétyl-P. Un second ATP est produit à partir de l'oxydation du glycéraldéhyde-3-P. La production nette est de deux ATP.

Une autre fermentation basée sur l'oxydation en 6-phosphogluconate utilise la voie d'Entner-Doudorof.

Quel que soit le type de fermentation lactique, homo- ou hétéro-lactique, l'acide pyruvique constitue un intermédiaire important du métabolisme des bactéries lactiques.

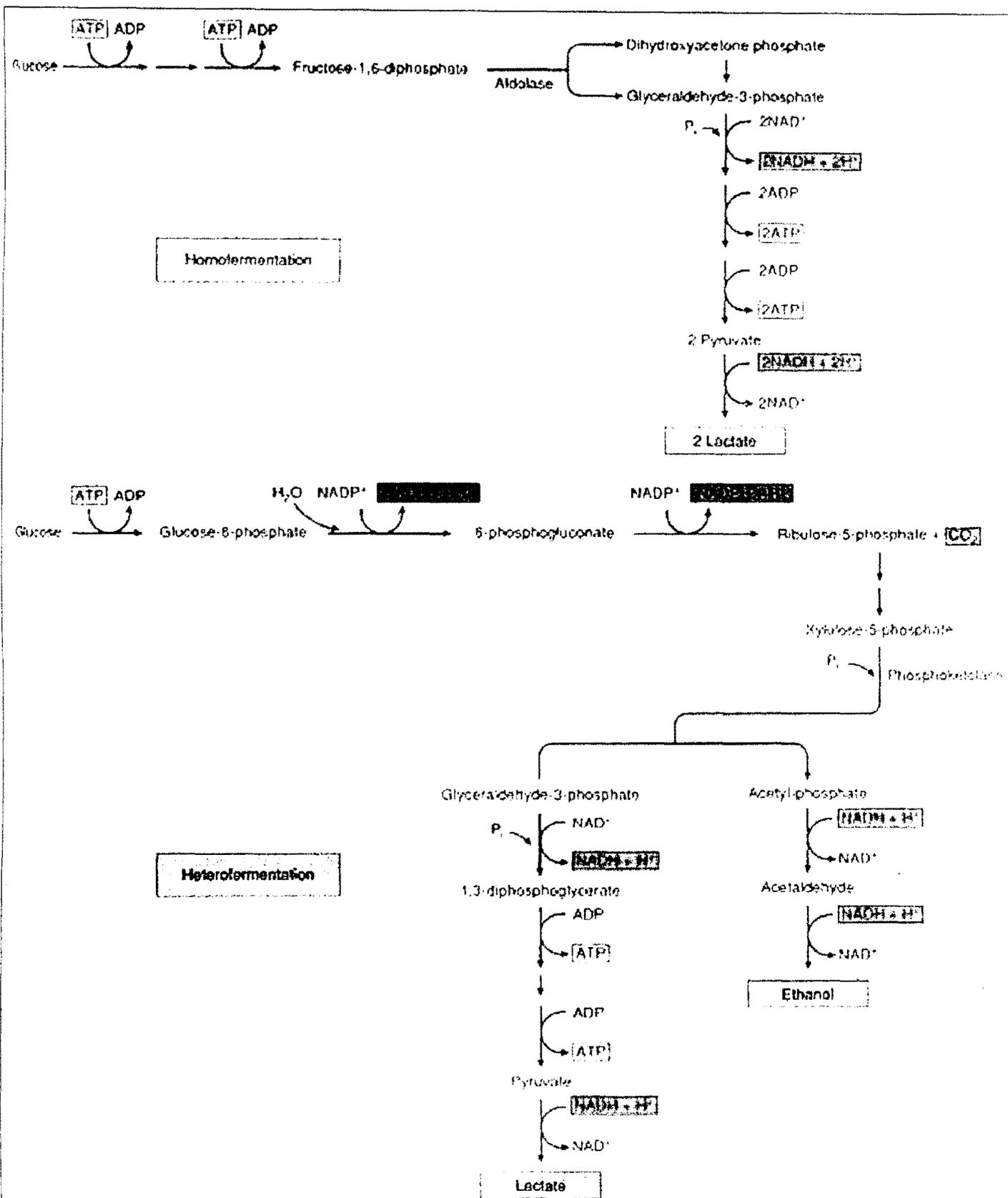


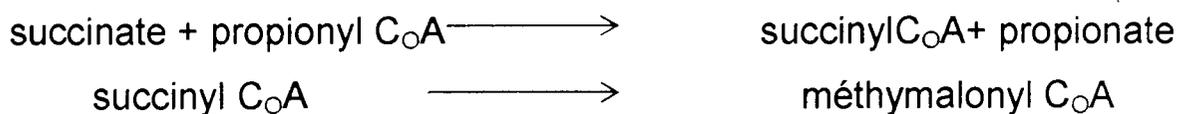
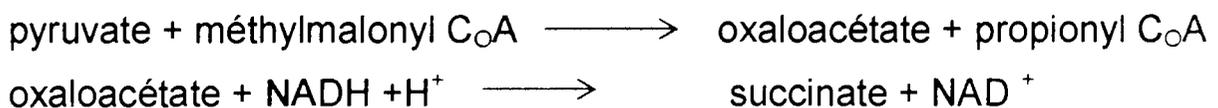
Figure 2 : Fermentation homolactique (3)
Fermentation hétérolactique

1.1.3 La fermentation acétique

L'acide acétique est le produit principal de la fermentation acétique. Il provient de l'oxydation de l'alcool. Comme bactéries acétiques, l'on peut citer *Clostridium acetium*, *C. thermoaceticum*, *Acetobacter woodi*, etc...

1.1.4 La fermentation propionique

L'acide propionique est le produit majeur de la fermentation propionique. La base de la fermentation propionique est la conversion de l'acide pyruvique en acide oxaloacétique par carboxylation et la réduction ultérieure de celui-ci en acide succinique avec réoxydation du $\text{NADH} + \text{H}^+$ en NAD^+ . L'acide succinique est décarboxylé pour fournir l'acide propionique comme produit final. La conversion de l'acide pyruvique en acide propionique implique une série cyclique des réactions qui peut être résumée de façon suivante :

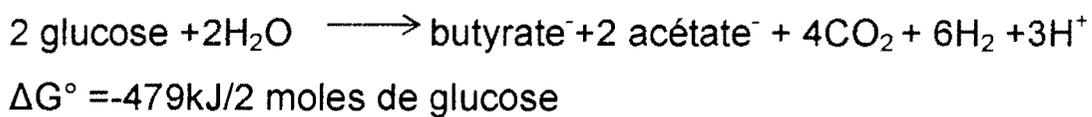


Les bactéries propioniques, notamment celles du genre *Propionibacterium*, fermentent l'acide lactique, le produit final de fermentation d'autres bactéries, en acides propionique et acétique et en dioxyde de carbone. Ces bactéries sont capables d'extraire un peu d'énergie de liaison à partir de l'acide lactique.

Le gain net est une molécule d'ATP. Cette réaction explique probablement la niche particulière dans l'écologie du rumen de l'animal qui est occupé par les bactéries propioniques.

1.1.5 La fermentation butyrique

Le glucose peut être converti en acides butyrique et acétique.

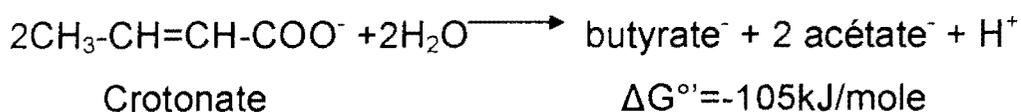


La réaction clé dans la fermentation butyrique est la formation d'acétoacétylCoA par la condensation de deux molécules d'acétylCoA dérivé du pyruvate ou d'acétate.

L'acétoacétylCoA est par la suite réduite par 2 molécules de NADH + H⁺ et l'acide butyrique se forme.

Les bactéries des genres *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium* et *Fusobacterium* métabolisent les sucres en pyruvate qui est converti ultérieurement en plusieurs produits dont l'acide butyrique, le butanol, l'acétone, l'isopropanol et le dioxyde de carbone.

Il existe des fermentations étroitement liées qui sont accomplies par *Clostridium kluyveri*



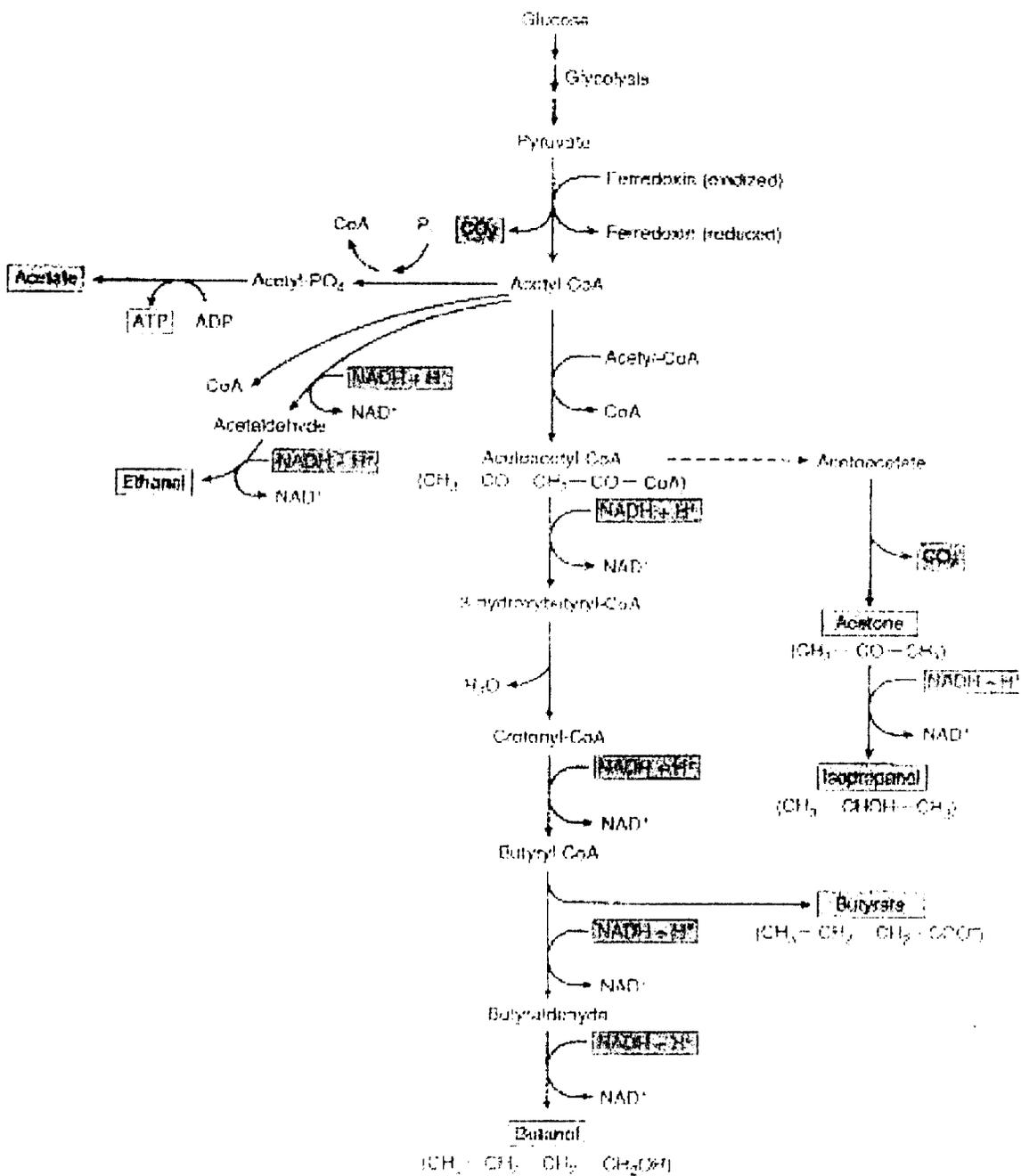
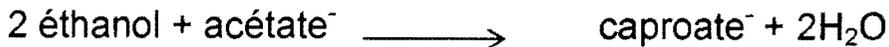
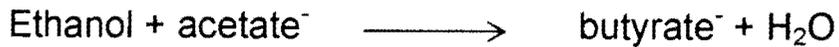


Figure 3 : Fermentation butyrique (3)

Une autre fermentation inhabituelle accomplie par *Clostridium kluyveri* est la conversion d'éthanol et acétate en butyrate et caproate



1.1.6 La fermentation acide mixte

La fermentation acide mixte permet la dégradation de l'acide pyruvique produit à partir du glucose en anaérobiose en différents produits selon les espèces de micro-organismes et leur complément d'enzymes. Elle produit :

(a) 3 acides majeurs (l'acide lactique, l'acide succinique et l'acide acétique), (b) l'éthanol, (c) et soit l'acide formique soit le dioxyde de carbone et l'hydrogène, selon l'absence ou la présence de l'enzyme hydrogène lyase formique.

Cette dégradation du pyruvate survient par une des deux voies distinctes de fermentation : la fermentation acide mixte et la fermentation butanediol (2) (3).

Les entérobactéries comme *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Enterobacter* sont impliquées dans la fermentation acide mixte. La réaction globale de la fermentation acide mixte peut être écrite ainsi :



$$\Delta G^{\circ} = -225 \text{ kJ/mole.}$$

La fermentation butanediol produit aussi les acides lactique, succinique et acétique mais en quantités plus faibles. D'autres produits de la fermentation butanediol sont le butanediol, l'éthanol, le dioxyde de carbone et l'hydrogène.

Les deux voies peuvent être facilement distinguées par la quantité d'acides produits.

Il y a plus d'acides produits dans la fermentation acide mixte que dans la fermentation butanediol. Le rapport CO_2 / H_2 produit dans les deux voies est différent : le rapport est 1/1 dans la fermentation acide mixte mais 5/1 dans la fermentation butanediol.

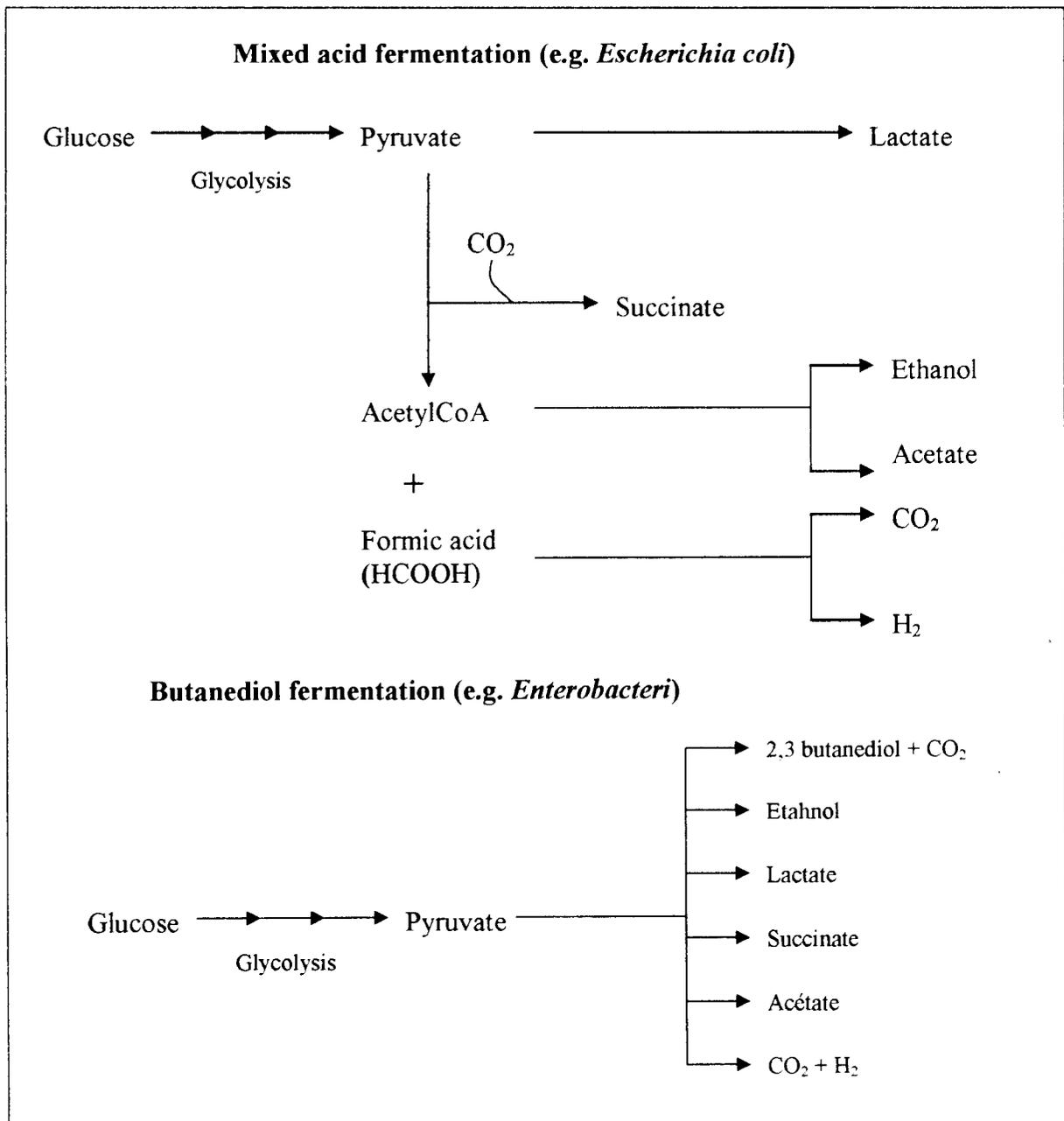


Figure 4 : Fermentation acide mixte (3)
 Fermentation butanediol (3)

Le glucose est initialement converti en acide pyruvique avec formation de deux molécules d'ATP et de deux de NADH. L'acide pyruvique est scindé en acétyl-CoA et acide formique par la pyruvate-lyase. La moitié de l'acétyl-CoA est clivée en acide acétique via l'acétyl-P avec production d'ATP tandis que l'autre est réduite en éthanol en utilisant deux molécules de NADH produites dans l'oxydation initiale du triose phosphate. L'énergie globale fournie est de 3 molécules d'ATP par molécule de glucose. Quelques molécules de glucose sont aussi converties en acides D-lactique et succinique : d'où le nom de fermentation acide mixte.

Dans quelques fermentations acides mixtes, notamment chez *Shigella*, l'acide formique s'accumule mais dans d'autres cas, par exemple chez *E. coli*, il est converti en dioxyde de carbone et hydrogène.

Les fermentations acides mixtes ne se limitent pas aux bactéries. Les trichomonades, protozoaires flagellés parasites, ont aussi un métabolisme aérobie où le pyruvate est converti en acétate, succinate, dioxyde de carbone et hydrogène.

1.1.7 La fermentation méthanique

La production du méthane par les bactéries anaérobies a lieu par le transfert de méthyle à partir de méthylcobalamine, une réaction très importante dans la biosphère. Les bactéries méthanigènes peuvent convertir les groupes méthyles du méthanol, de l'acétate ou $N^{15}-CH_3$ THF en méthane et peuvent aussi réduire en méthane le CO_2 , le formaldéhyde ou le formate (4).

Le clivage complet de la matière organique biodégradable dans les écosystèmes anaérobies sans lumière ou accepteur d'électrons autre que le CO_2 implique au moins trois groupes métaboliques généraux de

microorganismes. Un groupe complexe d'anaérobies hydrolyse et fermente les substrats primaires avec production majeure d'acides gras, CO₂, H₂ et ammonium. Le groupe métabolique intermédiaire, les bactéries acétogènes, oxydent les acides gras en acétate, CO₂, et H₂. Enfin, le groupe terminal, les bactéries méthanigènes, utilisent d'abord l'hydrogène, le formate, le CO₂ ou l'acétate comme source d'énergie et convertissent ces composés en méthane et CO₂ (2) (3) (5) (6).

1.1.8 La fermentation alcaline

La fermentation alcaline est un processus essentiellement protéolytique. Elle est caractérisée par l'alcalinisation du pH, l'hydrolyse des protéines en acides aminés et peptides et la libération d'ammoniaque. Les fermentations alcalines sont dominées par les bacilles, principalement *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus pumilus* (7) (8) (9).

1.2 UTILITE DES FERMENTATIONS

Les fermentations sont mises à profit par l'homme pour répondre à ses besoins dans plusieurs domaines : alimentation, santé, énergie, industrie, assainissement de l'environnement, etc... Elles fournissent des enzymes, des antibiotiques, des arômes, des saveurs, des vitamines, des surfactants, des pigments, etc... Les microorganismes sont donc utilisés comme usines chimiques ou comme produits de fermentation eux-mêmes. Les produits de fermentation sont soit dans les cellules soit sécrétés dans le milieu.

La fermentation alcoolique est utilisée pour la fabrication des boissons alcoolisées et au pain. Dans le cas des boissons alcoolisées, on cherche à produire de l'alcool plutôt que du dioxyde de carbone qui est plus utile

dans la fabrication du pain. Les boissons alcoolisées sont classées en 3 catégories : les vins et les bières fabriqués par fermentation d'un jus extrait de fruit ou d'une macération sucrée de grain, les vins coupés avec de l'eau de vie pour augmenter leur degré d'alcool et spiritueux obtenus par distillation des vins ou des bières. En ce qui concerne le pain, les bulles de dioxyde de carbone produit lors de la dégradation des sucres par les levures sont piégées dans la pâte et donnent au pain après cuisson sa texture alvéolaire caractéristique (10) (11) (12).

La fermentation alcoolique fournit également de l'éthanol à partir des déchets contenant le sucre, l'amidon ou la cellulose. Les déchets contenant l'amidon et la cellulose sont au préalable convertis en sucres avant la fermentation.

La fermentation lactique est employée pour la fabrication des produits laitiers (fromages, yaourts, beurre, boissons fermentées de lait, etc...) et l'obtention des aliments fermentés (légumes fermentés, saumures, etc...) avec production d'autres acides et composés donnant la saveur aux aliments. Il en est de même pour l'ensilage. Quant à la fermentation acétique, elle est utilisée pour la production du vinaigre à partir du vin (11) (13).

La fermentation alcaline touche des aliments riches en protéines/lipides et donne des produits qui ont une forte saveur, par exemple le *dawadawa* (nigérian), le *soumbala* (malien ou ivoirien), le *natto* (japonais) et l'*ogiri* (nigérian) (7) (8) (9) (14).

Figure 5 : Quelques aliments fermentés et microorganismes impliqués dans la fermentation

Aliments fermentés	Matière première	Microorganismes	Type de fermentation
Bière kaffir	Maïs ou sorgho	Saccharomyces cerevisiae Lactobacillus delbrueckii	alcoolique
Tapé ketan (pâte)	Manioc (racine)	Amylomyces rouxii Endomycopsis burtonii	
Vin	Raisin (jus)	Saccharomyces cerevisiae Saccharomyces champagnii	
Pain	Blé (farine)	Saccharomyces cerevisiae	
Choucroute	Chou (légume)	Lactobacillus plantarum Leuconostoc sp	lactique
Fromage blanc	Lait	Streptococcus lactis	
Yoghourt	Lait	Streptococcus thermophilus Lactobacillus bulgaricus	
Gari	Manioc (racine)	Corynebacterium manihot Geotrichum candidum	
Ogi (bouillie)	Maïs et mil	Lactobacillus delbrueckii	
Tempeh	Soja	Rhizopus oligosporus	alcaline
Dawadawa ou Soumbala	Graines	Bacillus	
Natto	Graines (soja)	Bacillus Aspergillus oryzae	
Ntoba mbodi	Feuilles	Bacillus	

Le lait, les légumes, les céréales, les tubercules et les graines sont utilisés comme matières premières. La fermentation conduit à des changements dans la couleur, l'arôme, la flaveur et la texture. Elle contribue à l'amélioration de la valeur nutritionnelle par l'augmentation de la teneur en protéines, vitamines, etc ... Pour le lait et les légumes, la fermentation sert essentiellement à conserver les éléments nutritifs alors que pour les autres aliments traditionnels elle sert à augmenter le goût et la saveur avec accroissement de la teneur en protéines.

La fermentation des composés cellulosiques (glucose, pentoses) est susceptible de fournir des produits chimiques de base clé pour l'industrie, notamment l'industrie chimique : éthanol, acide acétique,

acétone, n-butanol ou 2,3-butanediol et peut-être des phénols (aromatiques) (15) (16).

La fermentation microbienne avec les cellules de levures, bactéries, champignons et algues permet la production de protéines unicellulaires. Celles-ci sont utilisées comme aliments pour homme ou pour animal.

La fermentation anaérobie des déchets fournit le bio gaz, constitué essentiellement de méthane et de dioxyde de carbone. Les déchets digérés peuvent être utilisés comme fertilisants. Au cours de cette fermentation anaérobie, il y a non seulement réduction des pathogènes fécaux mais aussi des pathogènes des plantes qui sont dans les résidus d'une récolte à l'autre (6) (10).

Parmi les produits de fermentation, l'on peut citer d'une part les polymères protéiques, notamment les enzymes qui peuvent être utilisées en industries alimentaires, chimiques, et pharmaceutiques et d'autre part les polymères non protéiques, principalement les polysaccharides et le poly-bêta-hydroxybutyrate. Beaucoup de polymères non protéiques trouvent application dans l'industrie alimentaire comme agents émulsifiants et comme agents donnant de la texture aux produits alimentaires. Ils sont aussi utilisés comme matrices insolubles pour immobiliser les enzymes et les cellules (17) (18).

Parmi les petites molécules obtenues par fermentation microbienne, l'on compte les antibiotiques, les acides aminés et les acides organiques (19). Les molécules d'antibiotique comprennent des peptides, des glucides, des hydrocarbures, des dérivés benzéniques et d'autres espèces chimiques. Quant aux acides aminés, ils sont utilisés comme suppléments nutritionnels chez l'homme et les animaux. Beaucoup d'autres composés synthétisés lors des fermentations possèdent une activité pharmacologique (16) : anti-inflammatoire, hormone, insecticide, etc....

Figure 6 : Production microbiologique de quelques composés par fermentation

Polymères Cellulose Levanne Poly-β Hydroxy-butyrates	Microorganismes <i>Acetobacter sp</i> <i>Bacillus sp</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Alcaligenes eutrophus</i> <i>Methylbacterium organophilum</i>	Acides aminés L-arginine L-Lysine L-Leucine	Microorganismes <i>Brevibacterium flavum</i> <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Brevibacterium lactofermentum</i>
Antibiotiques Erythromycine Gramicidines Penicillines	Microorganismes <i>Streptomyces erythreus</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Enzymes Alpha-Amylase Cellulases Pullulanase	Microorganismes <i>Bacillus amylo-liquefaciens</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Aerobacter aerogenes</i> <i>Bacillus cereus var. mycoides</i>
Arômes et saveurs Citronelle Diacétyl Géraniole	Microorganismes <i>Ceratocystis variispora</i> <i>Trametes odorata</i> <i>Streptomyces diacetylactis</i> <i>Ceratocystis variispora</i>	Vitamines Vitamine B 12 Carotène (précurseur vitamine A) Riboflavine	Microorganismes <i>Bacillus sp</i> <i>Propionibacterium shermanii</i> <i>Pseudomonas denitrificans</i> <i>Blakeslea trispora</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Ashbya gossypii</i> <i>Eremothecium ashbyii</i>

Les fermentations constituent donc une source importante de composés (aliments, boissons, médicaments, produits chimiques, etc...) utiles à l'homme dont le champ d'action est vaste et divers et l'utilisation en augmentation (10) (11) (13) (15) (16) (20) (21).

Dans les fermentations alimentaires traditionnelles, les activités métaboliques qui prennent part sont l'apanage d'une vaste gamme de microorganismes. Les bactéries lactiques, par exemple, sont communément impliquées soit comme groupe unique soit en association avec d'autres bactéries, levures ou champignons dans les

procédés de transformations. Cependant, les activités métaboliques concertées qui ont lieu dans la plupart des fermentations traditionnelles alimentaires du Congo n'ont pas encore été totalement étudiées. Il existe pourtant des possibilités de développement des aliments fermentés indigènes d'origine végétale encore conduits au niveau artisanal ou familial.

Des exemples des procédés de fermentation hautement industrialisée sont ceux conduisant à la production du tempé, des bières, du vin. Dans tous ces cas, la compréhension fondamentale de l'écologie fondamentale des fermentations spontanées ou naturelles (association et interaction microbienne, facteurs écologiques), des conditions physico-chimiques et du procédé technologique et la mise au point et le développement des starters adéquats ont constitué des étapes nécessaires à l'amélioration des technologies et à l'intérêt accordé aux dits produits.

Une connaissance fondamentale de l'écologie microbienne des procédés de fermentation naturelle ou spontanée et la mise au point des starters sont donc nécessaires pour le développement des fermentations naturelles. Des exemples récents d'introduction réussie de cultures starters sont la production de la bière mageu avec *Lact. delbrueckii* et les fermentations des olives vertes espagnoles avec *Lact. plantarum*.

Au Congo, un savoir faire traditionnel incontestable a su, sans connaissance scientifique, exploiter les potentialités des procédés de fermentation. Parmi tous les aliments fermentés, nous avons étudié ceux qui sont représentatifs d'une habitude alimentaire à l'échelle nationale. Ce sont le tubercule roui de manioc, la pâte fermentée de maïs, les feuilles fermentées de manioc et le vin de palme. La caractéristique commune de tous ces produits, comme il en est de la plupart des

produits traditionnels, est la variabilité des qualités aussi bien organoleptiques qu'hygiéniques, car malgré le savoir faire empirique, les procédés demeurent sous l'influence non contrôlée des conditions environnementales et sont laissées au hasard de la fermentation spontanée.

Dans ce travail, notre objectif est double :

- *Améliorer la compréhension des mécanismes métaboliques survenant au cours des fermentations alimentaires.*

- *Dégager les caractéristiques fondamentales de chacune des fermentations.*

Notre étude va servir de guide de conduite pour lever les principales contraintes afin d'assurer l'amélioration du statut des aliments fermentés, éléments d'héritage culturel. Ces aliments sont bien connus et acceptés des consommateurs et en conséquence constituent une base appropriée pour le développement d'industries alimentaires locales lesquelles préservent non seulement les produits agricoles mais stimulent et permettent le développement agro-industriel. La production du tempé dont la production annuelle est estimée entre 150 000 et 500 000 tonnes par des petites unités de production est un exemple approprié de développement des capacités locales de transformation et donc de valorisation des légumes et céréales en produits fermentés à haute valeur ajoutée .

2. ALIMENTS FERMENTES DU CONGO

Le Congo présente une variété d'aliments fermentés traditionnels. Notre étude a porté sur quatre de ces aliments en raison de leur impact économique et culturel ou sociologique auprès des autochtones et du type de matière première végétale. Il s'agit de : « nsamba » (vin de palme), « poto-poto » (pâte fermentée de maïs), « bikedi » (tubercules rous de manioc) et « ntoba mbodi » (feuilles fermentées de manioc).

2.1- VIN DE PALME « NSAMBA »

Parmi les boissons locales consommées au Congo figure le vin de palme. Le vin de palme est obtenu par fermentation naturelle de la sève sucrée du palmier à huile (*Elaeis guineensis*). C'est un liquide blanchâtre, pétillant, à saveur sucrée et aigrelette, d'un goût assez agréable. Il est peu alcoolisé et contient 1,5 à 2,1 % d'éthanol (22). Son pH varie entre 4 et 5 (23). La concentration en sucres solubles de la sève du palmier varie entre 12 et 15 %, le principal sucre étant le saccharose. On trouve également en faible quantité le glucose, le fructose, le raffinose, le maltose et les oligosaccharides (24). La sève fermentée contient aussi des acides organiques et des acides aminés (25).

La flore microbienne du vin de palme est très diverse. Elle est constituée de bactéries lactiques, acétiques, de *Zymomonas spp.*, de microcoques et de levures (26) (27) (28) (29) (30). L'importance socio-économique de cette boisson (31) nous a conduits à étudier les caractéristiques microbiologiques du vin de palme et à suivre l'évolution du pH, des sucres réducteurs et des métabolites produits au cours de la fermentation (32) (33).

2.2- PATE FERMENTEE DE MAÏS « POTO-POTO »

En Afrique, le maïs (*Zea mays*) est transformé en plusieurs produits parmi lesquels la pâte fermentée. Obtenue selon un procédé extrêmement long et fastidieux (34), cette pâte est appelée "uji " ou " akamu" au Kenya (35), "ogi" au Nigeria (36), " koko" ou " akasa" au Ghana (37), "mahewu" en Afrique du Sud (38), et "poto-poto" au Congo où elle est utilisée particulièrement pour la préparation des aliments de complément (47 % de la population en zones rurales et 78 % à Brazzaville (39).

Malgré de nombreuses études portant sur la microflore, les produits organiques libérés ainsi que les possibilités d'amélioration (34), ce produit pose toujours de nombreux problèmes : qualités organoleptiques très variables (40) (41) (42), valeur nutritionnelle très pauvre (39), encombrement digestif, facteur étiologique de malnutrition chez les jeunes enfants (43), présence dans plusieurs cas d'une microflore de contamination.

Dans le présent travail, nous avons déterminé les principales étapes de la fermentation, l'incidence réelle de celle-ci sur la qualité microbiologique du produit et l'importance de la dégradation de l'amidon au cours du processus fermentaire.

Nous avons donc étudié la cinétique des paramètres microbiologiques (bactéries lactiques, entérobactéries, bactéries amylolytiques, levures), biochimiques (sucres, alcools, acides organiques) et physio-chimiques (pH, pO₂, température, matière sèche) pendant la production du *poto-poto*.

2.3- TUBERCULES ET FEUILLES DE MANIOC FERMENTES

La plante de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est une plante vivace qui peut atteindre, après croissance, une hauteur de 2 à 4 m environ selon les variétés. Les feuilles sont larges et palmées et comprennent 5 à 7 lobes. Elles sont portées par un pétiole long et mince. Des grappes de racines (ou tubercules) mures de 30 à 120 cm de long et de 4 à 15 cm de diamètre apparaissent dans le sol. La racine possède deux parties : la partie externe constitue la peau et la partie interne la pulpe.

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est le troisième aliment sous les tropiques, après le riz et le maïs du point de vue des quantités consommées. Il est une source importante de calories car il couvre 60% des besoins calorifiques journaliers des populations en Afrique tropicale et en Amérique centrale (44). En Afrique centrale, notamment au Congo, le tubercule de manioc est consommé principalement sous forme de farine (foufou) ou de pain de manioc (chikwangué).

Par ailleurs, les feuilles de manioc sont utilisées pour la consommation humaine du fait de leur haute valeur nutritionnelle. Les feuilles de manioc sont riches en protéines, minéraux et vitamines. Elles sont riches en tous les acides aminés essentiels sauf la méthionine et la phénylalanine (45) (46) (47) (48) (49). Du point de vue nutritionnel, elles contiennent en poids sec 17 à 34 % de protéines et 16 à 26 % de fibres.

Le manioc contient, dans les tubercules et les feuilles, du cyanure présent sous forme de glucosides cyanogéniques : la linamarine et la lotaustraline (50) (51) dans un rapport de 93/7 (52). Le manioc est classé selon la teneur en acide cyanhydrique en 3 catégories :

- 1°) variété très toxique avec plus de 100 mg HCN/ kg de pulpe
- 2°) variété modérément toxique avec 50- 100 mg HCN/ kg de pulpe
- 3°) variété non toxique avec moins de 50 mg HCN/ kg de pulpe

L'hydrolyse de ces glucosides cyanogéniques par l'enzyme endogène linamarase libère l'acide cyanhydrique qui est toxique. Pour éliminer l'acide cyanhydrique létal aux doses de 0,5 à 3,5 mg par kilogramme de poids corporel et rendre les tubercules propres à la consommation, les populations pratiquent une fermentation traditionnelle, notamment le rouissage (53) (54) (55). En outre, cette fermentation permet une production importante d'acides organiques et un ramollissement des tubercules (56) (57) (58) (59) (60), indispensable pour les opérations ultérieures de transformation.

Les caractéristiques organoleptiques (couleur, texture, odeur, goût) dépendent du type de manioc, des conditions de rouissage et des microorganismes présents. La nécessité de maîtriser les qualités organoleptiques et hygiéniques du manioc rouï passe donc par une meilleure connaissance du phénomène de rouissage, notamment de la dynamique des populations microbiennes.

Plusieurs travaux ont été consacrés aux microorganismes pour leur importance dans les qualités hygiéniques et organoleptiques du manioc roui (61) (62). Mais ces travaux donnent peu d'indication sur l'évolution des principaux groupes microbiens impliqués dans le processus du rouissage.

Pour pouvoir améliorer la qualité des produits finis et envisager un traitement contrôlé des tubercules, il est apparu nécessaire de déterminer l'efficacité de ces techniques ancestrales dans la réduction de la teneur des composés cyanés, d'établir les caractéristiques physico-chimiques du processus et de préciser les mécanismes mis en jeu.

Si beaucoup d'études ont été consacrées à la microbiologie du rouissage (56) (59) (63) et au phénomène de ramollissement (58) (59) (60), la compréhension de la détoxification reste encore très controversée

et aucune conclusion définitive relative au mécanisme de détoxification ne peut être retenue (61) (62) (63).

Ces composés cyanogéniques possèdent un goût amer et sont responsables de la toxicité des tubercules et feuilles de manioc non fermentés (64) (65). La linamarine non hydrolysée restante, présente dans les tubercules et feuilles de manioc transformées, peut présenter des problèmes de santé pour les consommateurs. (47)(63) (67) (68). En effet, la linamarine peut être hydrolysée dans le corps en libérant le cyanure (63), (69), (70). L'exposition chronique au cyanure liée à la consommation du manioc est associée à un certain nombre de maladies induites par le cyanure comprenant le goitre, le dwarfisme et la neuropathie ataxique tropicale, cela est particulièrement un problème dans les régions où le manioc est la source majeure de calories (66) (69) (70) (71)

Les substances pectiques représentent un composant majeur de la lamelle moyenne et de la paroi des cellules végétales. Elles interviennent dans la cohésion des tissus végétaux. Les substances pectiques sont classées en acides pectiques, pectines faiblement méthylées ou pectines fortement méthylées selon que leur degré d'estérification D.E. (proportion en % des fonctions carboxyles estérifiées) est respectivement inférieur à 5%, compris entre 5 et 50% et supérieur à 50% .

Les enzymes pectolytiques

L'altération des substances pectiques est en général liée à l'action des enzymes pectolytiques, qui engendre des modifications importantes des structures cellulaires. Les enzymes pectolytiques peuvent être divisées (72) (73) en deux groupes sur la base de leur action :

- enzymes saponifiantes (pectinestérase E.C.3.1.1.11) qui hydrolysent les fonctions esters méthyliques en formant le méthanol et le pectate. Les pH optima des pectinestérases varient selon l'origine, autour de pH 4,0- 5,0 pour les champignons et de pH 7,0- 8,0 pour les végétaux.
- enzymes dépolymérisantes dont la classification repose sur la nature du substrat préférentiel (différencié selon D.E.), la nature de la réaction (hydrolyse ou β -élimination) et sur le mode d'action (attaque au hasard ou à partir d'une extrémité).

Dans le cas de la dégradation d'une pectine fortement méthylée, deux possibilités peuvent être envisagées : la pectine est dégradée soit directement par une pectine lyase (PL) , E.C.4.2.2.10, soit, après déméthylation de cette pectine par une estérase, par une pectate lyase (PAL) ou une hydrolase, la polygalacturonase (PG).

Les pectates lyases clivent le polygalacturonate par β - élimination. Il existe deux formes de pectate lyase : endo- pectate lyase (endo- PAL) et exo-pectate lyase (exo- PAL). L'endo-pectate lyase (E.C.4.2.2.2) donne par hydrolyse au hasard des acides oligogalacturoniques qui contiennent un résidu d'acide galacturonique Δ 4,5- insaturé à l'extrémité non réductrice. L'exo- pectate lyase (E.C.4.2.2.9) coupe à l'extrémité réductrice et donne des acides digalacturoniques avec un résidu d'acide galacturonique Δ 4,5- insaturé à l'extrémité non réductrice. Le pH optimum est de 8- 8,5 pour exo- PAL et de 8- 9,8 pour endo- PAL.

La polygalacturonase existe sous deux formes : l'endo-polygalacturonase (E.C.3.2.1.15), endo- PG, et l'exo- polygalacturonase (E.C.3.2.1.67), exo- PG. Toutes les deux enzymes coupent seulement les liaisons glycosidiques entre molécules d'acide galacturonique du polygalacturonate. L'endo- polygalacturonase (endo- PG) hydrolyse au

hasard et donne des acides oligogalacturoniques alors que l'exopolygalacturonase (exo- PG) clive à l'extrémité non réductrice en libérant l'acide galacturonique. Le pH optimum pour l'endo- PG est d'environ 4-5 et pour exo- PG 4,5- 5,5.

La pectine lyase (PL) coupe au hasard les liaisons glycosidiques de la pectine (polyméthyl polygalacturonate) et donne des acides oligogalacturoniques méthylés insaturés. Son pH optimum est d'environ 5-6

Les pectines lyases sont connues principalement chez les champignons alors que les pectates lyases sont connues chez les bactéries et les champignons (74).

La rupture des tissus végétaux peut entraîner le brunissement du produit.

Le brunissement

Le brunissement résulte de l'oxydation enzymatique par les polyphénoloxydases (E.C.1.10.3.1) et non enzymatique des composés phénoliques. Il modifie les propriétés sensorielles des produits à cause des changements associés de couleur, de flaveur et de ramollissement, à cause probablement de l'action des enzymes pectinolytiques. La rupture des parois et membranes cellulaires permet à l'oxydation enzymatique d'avancer beaucoup plus rapidement (75) (76) (77) (78).

a- brunissement enzymatique

Dans le brunissement enzymatique, les orthoquinones, qui sont des produits initiaux de l'oxydation enzymatique des orthophénols par la polyphénol oxydase, se condensent rapidement pour produire des polymères bruns relativement insolubles, les mélanines.

Phénols $\xrightarrow{1}$ orthophénols $\xrightarrow{2}$ orthoquinones $\xrightarrow{3}$ Polymères colorés

1 : hydroxylation enzymatique

2 : oxydation enzymatique

3 : réaction non enzymatique

Les oxydases comme la polyphénol oxydase peuvent accélérer des réactions d'oxydo-réduction impliquant des orthoquinones, l'acide ascorbique et des anthocyanes monomériques.

b- brunissement non enzymatique

Le brunissement non enzymatique des aliments (76) (77) peut avoir lieu par la réaction de Maillard, la dégradation de Strecker et les réactions d'autooxydation impliquant des composés phénoliques et la formation des complexes fer-phénol (brunissement d'acide ascorbique).

La réaction de Maillard fait intervenir les groupements réducteurs libres et les groupements amine des acides aminés libres (sérine, thréonine, alanine, acide aspartique, notamment) présents dans la pâte.

Le brunissement est quelquefois désirable dans la mesure où il peut améliorer les propriétés sensorielles de quelques produits comme les feuilles fermentées de thé et le pain. Dans la fabrication du pain, ce sont principalement les constituants hydrosolubles qui confèrent au pain ses caractéristiques de goût, notamment les sensations d'acidité et d'amertume. Les sensations d'acidité sont dues aux acides organiques formés au cours de la fermentation tandis que celles d'amertume proviennent de la cuisson par des réactions de brunissement non enzymatique ou réaction de Maillard (10) (11).

Notre étude de la fermentation a porté sur :

- l'évolution des paramètres physico-chimiques, pH, pression d'oxygène, indice de pénétrométrie des tubercules de manioc (ramollissement), indice de réfraction, brunissement
- l'évolution des paramètres biochimiques, acides organiques, éthanol, cyanures totaux
- l'évolution de la microflore lactique, des levures, des bactéries pectinolytiques et amylolytiques :
 - la caractérisation des bactéries lactiques
 - la détermination de la capacité des bactéries lactiques à produire la linamarase et de leur sensibilité au cyanure,

A partir de produits de fermentation des tubercules et feuilles de manioc, nous avons tenté une approche pour déterminer le mécanisme de détoxification.

CHAPITRE 2
PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1.- METHODOLOGIE

La méthodologie a été décrite en détail dans les publications jointes.

Etude préliminaire de la microbiologie du vin de palme *Elaeis guineensis*
-LOUEMBE D., KOBAWILA S.C., MICHAUX O., LARPENT M., -
Microbiologie –Aliments – Nutrition , 1985 , vol. 4 , 75

Les bactéries lactiques du manioc au cours du rouissage :
caractérisation et évolution –MALONGA M., MAVOUNGOU O.,
KOBAWILA S.C., LOUEMBE D., BRAUMAN A .,- Microbiologie –
Aliments- Nutrition , 1993 , vol . 11 : 471-475

Etude microbiologique et biochimique du vin de palme (*Elaeis guineensis*
Jacq) en République du Congo –MALONGA M., MAVOUNGOU O.,
KOBAWILA S.C ., LOUEMBE D .- Microbiologie Aliments –Nutrition ,
1995 , vol .13 :195-200.

Aspects microbiologiques et biochimiques du rouissage du manioc –
MALONGA M ; MAVOUNGOU O., KELEKE S., KOBAWILA S.C.,
LOUEMBE D., -Microbiologie- Aliments -Nutrition, 1996, vol. 14 : 73-81

Etude microbiologique et biochimique de la bouillie de maïs, « potopoto ».
LOUEMBE D., BRAUMAN A., TCHICAYA F., KOBAWILA S.C.-
Microbiologie- Aliments – Nutrition, 1996, vol .14 : 245-253.

Evolution de la teneur en composés cyanés des tubercules de manioc
au cours du rouissage –Activité linamarasique de bactéries lactiques.-
LOUEMBE D., MALONGA M., KOBAWILA S.C. , MAVOUNGOU O .,-
Microbiologie – Aliments – Nutrition , 1997 , vol . 15 : 53 –60

Pour les analyses microbiologiques, les milieux de culture étaient utilisés en fonction du matériel végétal, des microorganismes et de l'activité biochimique recherchés.

Milieu PCA (Plate Count Agar) pour la flore mésophile totale ; culture à 30°C et 37°C pendant 24 à 72 heures.

Milieu MRS gélosé à pH 5,5 pour les bactéries lactiques ; ensemencement en double couche et incubation à 30 °C et 37°C pendant 24 à 72 heures.

Milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar) acidifié à pH 3,5 avec de l'acide tartrique à 10% et additionné de chloramphénicol à 0,5% pour la sélection des levures et des moisissures ; ensemencement en surface et incubation à 30°C et 37 °C pendant 3 à 5 jours .

Milieu BP (Baird Parker) à pH 7,2 pour la sélection des staphylocoques ; ensemencement en surface et incubation à 30°C et 37 ° C pendant 24 à 72 heures.

Milieu Agar lactosé au désoxycholate pH 7,3 pour entérobactéries pathogènes ; ensemencement en double couche et incubation à 30°C et 37°C pendant 24 à 72 heures

Milieu TSN (Trypticase Sulfite Néomycine) pH 7,2 pour la recherche de *Clostridium* ; ensemencement en surface et incubation à 30°C et 37°C pendant 24 à 72 heures en anaérobiose.

Milieu NAA (Nutrient Agar amidon soluble, Sigma) pH 6,7-6,8 pour les bactéries amylolytiques ; ensemencement en surface à l'aide de billes de verre et incubation à 30°C pendant 48-72 heures.

Milieu EMB (Gélose éosine de méthylène) pour les entérobactéries, culture à 37 °C pendant 24 -48 heures en anaérobiose.

Milieu PFP (79) en boîte de Pétri pour les bactéries pectinolytiques ; incubation à 37°C en aérobie et en anaérobie pendant 4 à 5 jours ; l'hydrolyse de la pectine se traduit par la présence de dépression autour des colonies.

Milieu JP2, pH 6,7-6,8 pour les bactéries amylolytiques ; ensemencement en surface et incubation 28°C pendant 48-72 heures ; pour la mise en évidence du pouvoir amylolytique, les boîtes sont exposées à des vapeurs d'iode pendant 5 à 10 minutes, l'activité amylolytique se révélant par la formation d'un halo autour de la colonie.

MRS amidon additionné de bleu d'aniline à 2% pour les bactéries lactiques amylolytiques ; après incubation à 30°C pendant 48 -72 heures, toutes les colonies bleues, sans activité catalasique, présentant une plage d'hydrolyse d'amidon après exposition aux vapeurs d'iode sont comptées.

Milieu au malt à 2 % additionné de rose bengale à 1 % pour les levures (culture à 37 ° C pendant 48 heures).

Glucose Yeast Agar (G.Y.A) pour les *Zymomonas* (culture en double couche à 25 °C pendant 48 heures)

Milieu de Terzaghi (M17 pour les streptocoques lactiques (culture en double couche à 30 ° C pendant 48 à 72 heures).

Les microorganismes sont dénombrés après culture selon la méthode de Miles et Misra décrite par Collins et Lyne (80). Les milieux sont ensemencés avec 0,1 ml des différentes dilutions à raison de trois boîtes pour chaque dilution. Le résultat correspond à la moyenne des nombres de colonies développées (entre 30 et 300 colonies par boîte).

Après dénombrement, les colonies, prélevées à différents temps, sont purifiées et soumises aux tests physiologiques et biochimiques d'identification selon les méthodes décrites par Harrigan *et al* (81). L'identification des souches à partir des résultats de ces tests a été effectuée selon les données de Bergey's Manual (82) et à l'aide des différentes galeries API.

L'identification des levures est conduite selon la clef de Barnett (83) et Lodder (84) à partir des caractéristiques culturelles, morphologiques, sexuelles, physiologiques et des capacités d'assimilation et de fermentation des sucres (galeries API 20C AUX)

En ce qui concerne les analyses physico-chimique et biochimique, les mesures de l'acidité totale sont faites selon les méthodes usuelles et le pH déterminé avec le pH mètre. La pression d'oxygène dissous est mesurée à l'aide d'un oxymètre, le ramollissement avec un pénétromètre et le brunissement par spectrophotométrie à 420nm.

La teneur en composés cyanés est déterminée par les méthodes chimiques, l'activité des enzymes pectinolytiques à l'aide du spectrophotomètre et le dosage des sucres réducteurs, de l'éthanol et des acides gras volatils par HPLC et celui des composés phénoliques par spectrophotométrie.

Le dosage des anthocyanes est effectué par la mesure de l'absorbance au maximum d'absorption (480nm) d'une solution d'échantillon de feuilles fermentées de manioc à doser en milieu tampon (pH= 3,5) et en milieu très acide (pH= 0,6). La différence de densité optique est comparée à une courbe étalon obtenue avec des solutions de chlorure d'apigénidine pure (85).

2.- LES PROCEDES DE PRODUCTION D'ALIMENTS FERMENTES

2.1- Pâte fermentée de maïs « poto-poto »

Matériel végétal

Il est constitué de grains de maïs secs (variété blanche) provenant de marchés de Brazzaville.

Préparation du "poto-poto"

Le procédé de préparation du poto-poto par l'atelier de production retenu pour notre étude est représenté ci-dessous. La première étape de la fabrication consiste à tremper les grains de maïs dans l'eau pendant 21 heures. A la fin du trempage, les grains de maïs égouttés sont broyés au moulin. La farine obtenue est défibrée par tamisage à l'eau à travers un tissu en mousseline. Le lait d'amidon est recueilli et décanté pendant 15 heures. Après décantation, la pâte obtenue est mise dans un sac en toile et soumise à un égouttage pendant trente minutes.

L'étude des différents paramètres de la fermentation du maïs est réalisée à chaque étape de la production (grains ; farine humide : lait d'amidon en décantation). La codification des échantillons est la suivante :

G 0 : Grains secs au moment du trempage- G 7 : Grains après 7 heures de trempage- G 14 : Grains après 14 heures de trempage - G 21 : Grains après 21 heures de trempage- F.H. : Farine humide après broyage des grains- P 0 : Pâte défibrée au moment de la décantation- P 5 : Pâte défibrée après 5 heures de décantation- P 10 : Pâte défibrée après 10 heures de décantation- P 15 : Pâte défibrée après 15 heures de décantation.

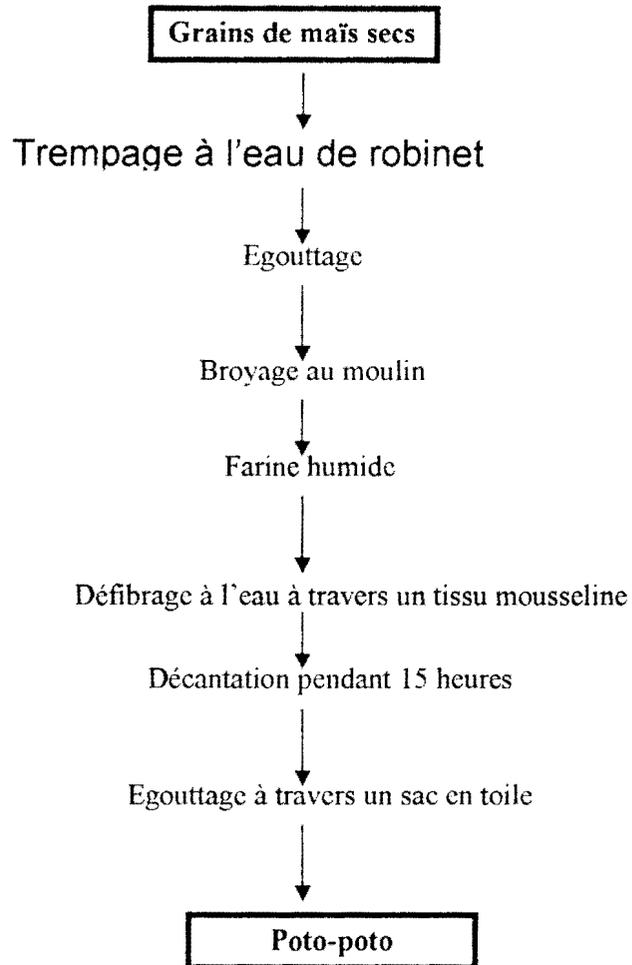


Figure 7 : Diagramme de production de poto-poto

2.2- Tubercules de manioc rouis

Matériel végétal

Les tubercules de manioc (*Manihot esculenta* var. Ngansa) âgés de 18 mois proviennent des plantations d'Agri - Congo à Brazzaville.

Préparation du tubercule de manioc roui- le procédé de production du tubercule de manioc utilisé est présenté dans le diagramme ci-dessous : la première étape consiste à éplucher les tubercules de manioc

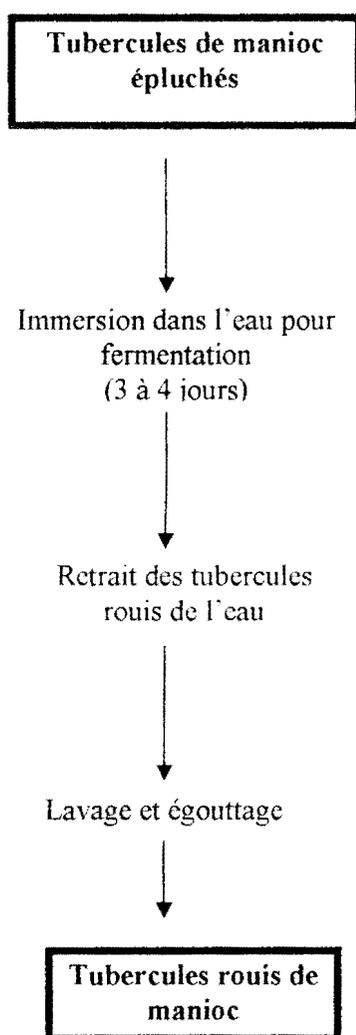


Figure 8 : Diagramme de production de tubercules rouis de manioc

2.3- Feuilles de manioc fermentées

Matériel végétal

Les feuilles de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) utilisées sont âgées de 2 semaines à 3 mois. Elles ont été récoltées des plantations de manioc des environs de Brazzaville.

Préparation des feuilles fermentées de manioc « *ntoba mbodi* »

Le procédé de fabrication de *ntoba mbodi* utilisé est représenté dans le diagramme ci-dessous.

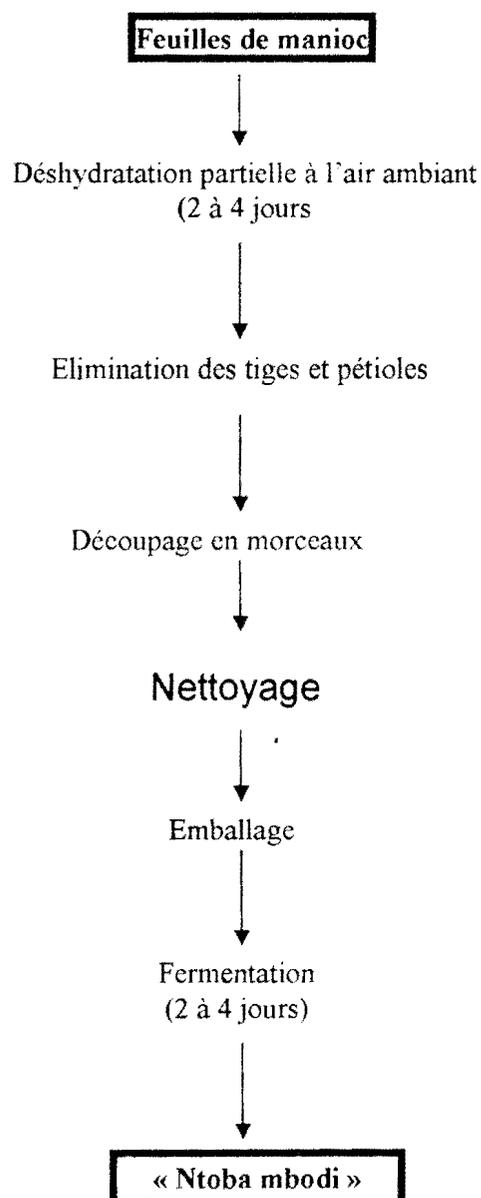


Figure 9 : Diagramme de production de *ntoba mbodi*

CHAPITRE 3

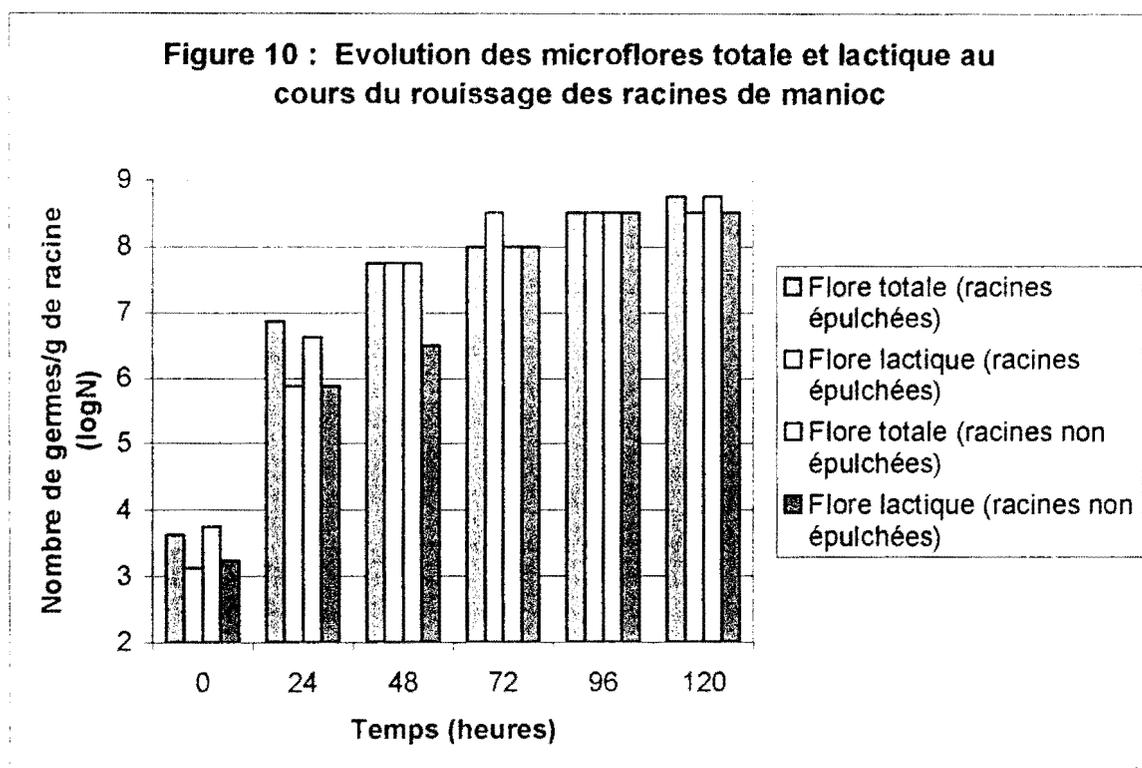
RESULTATS

1 MICROFLORE CARACTERISTIQUE ADAPTEE ET SELECTIONNEE SELON LES CONDITIONS DE L'ENVIRONNEMENT

1.1 TUBERCULES ROUIS DE MANIOC

1.1.1. Dénombrement de la microflore lactique

La figure 10 donne un exemple des résultats du dénombrement de la microflore isolée d'échantillons de tubercules de manioc en cours de rouissage.



Les profils des courbes de dénombrement (logarithme du nombre de germes par gramme de racines brutes en fonction du temps de rouissage) sont identiques pour les tubercules épluchés et les tubercules non épluchés.

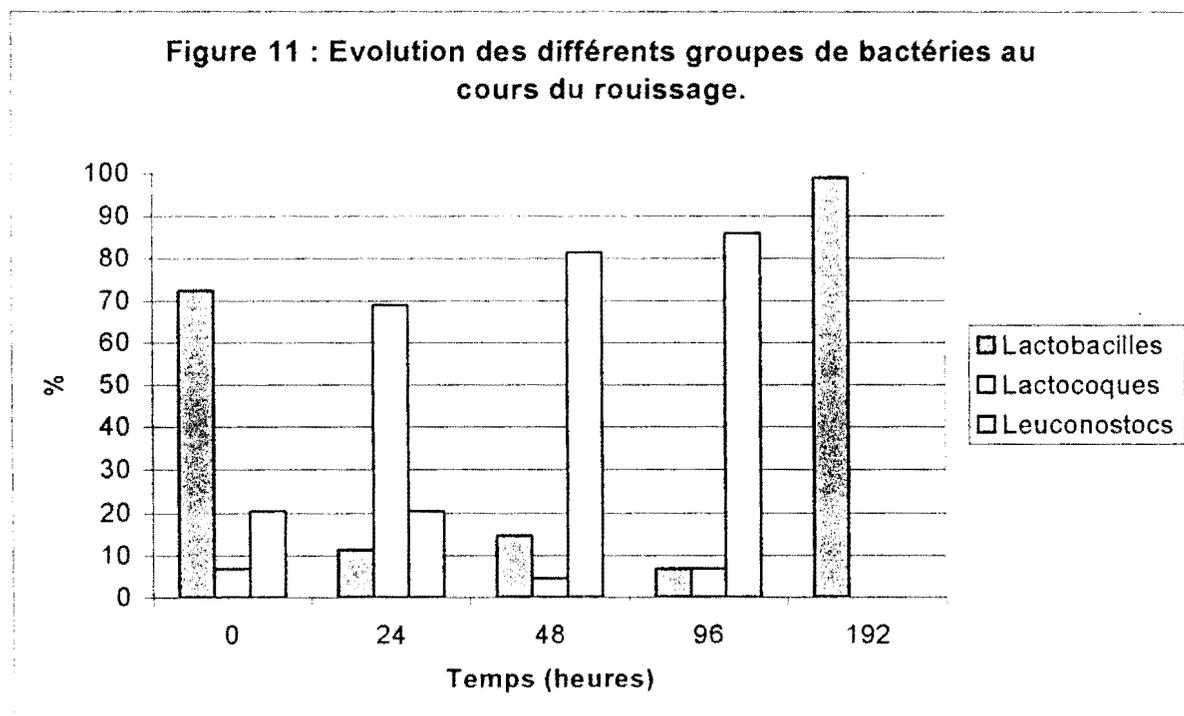
A la fin du rouissage, entre les troisième et quatrième jours, le nombre de bactéries totales et lactiques tend à devenir égal pour les deux types

d'échantillons de tubercules. Ce nombre est voisin de 10^9 bactéries par gramme dans la pâte de manioc.

La population bactérienne des échantillons de tubercules est composée essentiellement de bactéries lactiques après 24 heures de rouissage. Cette flore lactique par rapport à la flore totale est relativement importante au début du rouissage. Entre le troisième et quatrième jours de rouissage apparaît la phase stationnaire. Les dénombrements des constituants de la microflore dans la pâte de manioc rouï révèlent que les bactéries lactiques restent prépondérantes.

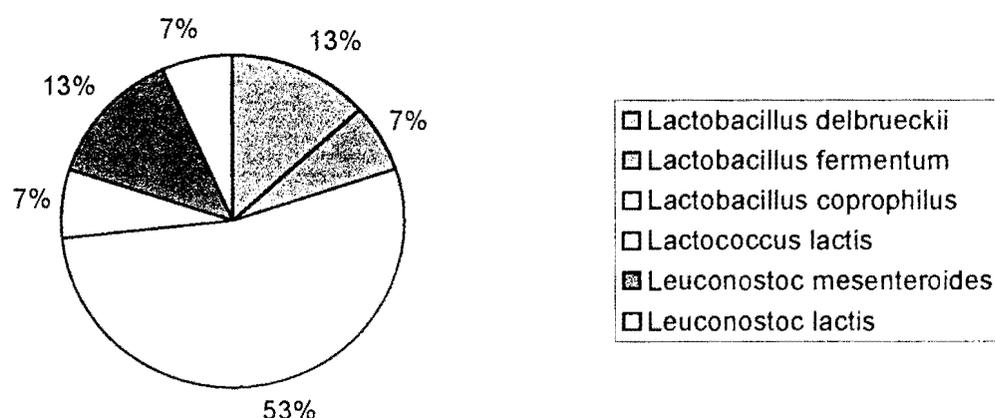
1.1.2 Identification et évolution des bactéries lactiques

La figure 11 montre la distribution des populations bactériennes lactiques au cours du rouissage.



Il apparaît que la microflore lactique initiale (figure 12) est essentiellement composée de : - Lactobacilles (73, 3%) parmi lesquels *Lactobacillus delbrueckii* (13,3%), *Lb. fermentum* (6,7%) et *L. coprophilus* (53, 3%) – Lactocoques représentés par *Lactococcus lactis* (6, 7%) – *Leuconostocs* (20 %) dont *Leuc. mesenteroides* (13, 3%) et *Leuc. lactis* (6,7%).

Figure 12: Répartition des bactéries lactiques dans les tubercules de manioc frais

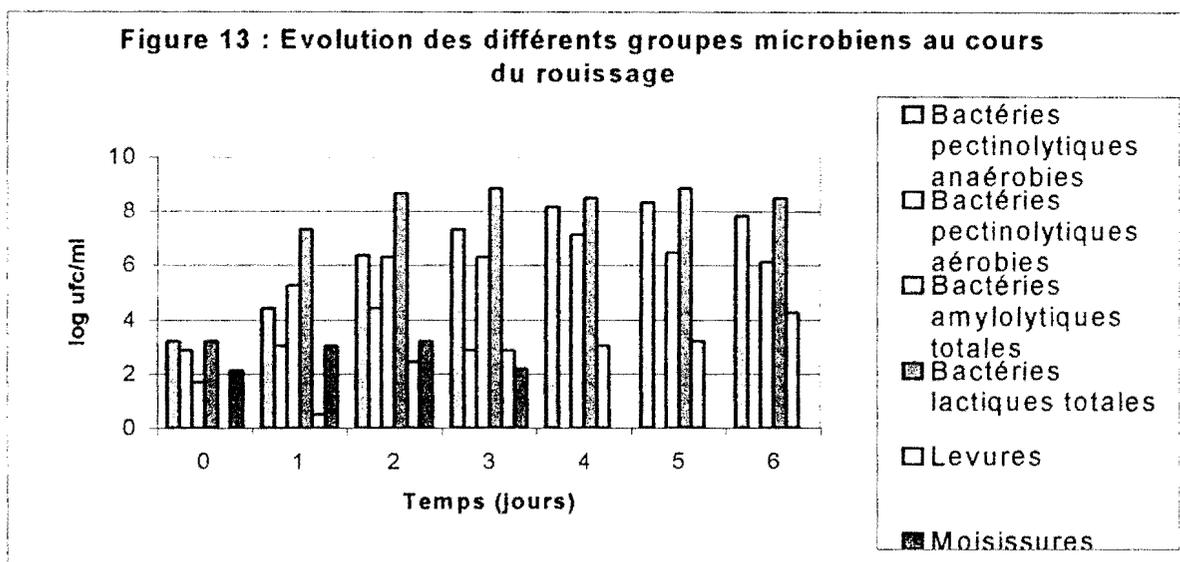


Après 24 heures de rouissage, *Lactococcus lactis* constitue la microflore dominante. Cette espèce est supplantée entre 48 et 96 heures par *Leuc. mesenteroides*. *Leuc. lactis*, présent au début du rouissage, n'a pas été identifié. En fin de rouissage (huitième jour), *Lb plantarum* devient l'espèce dominante.

1.1.3 Dénombrement de la microflore lactique et non lactique.

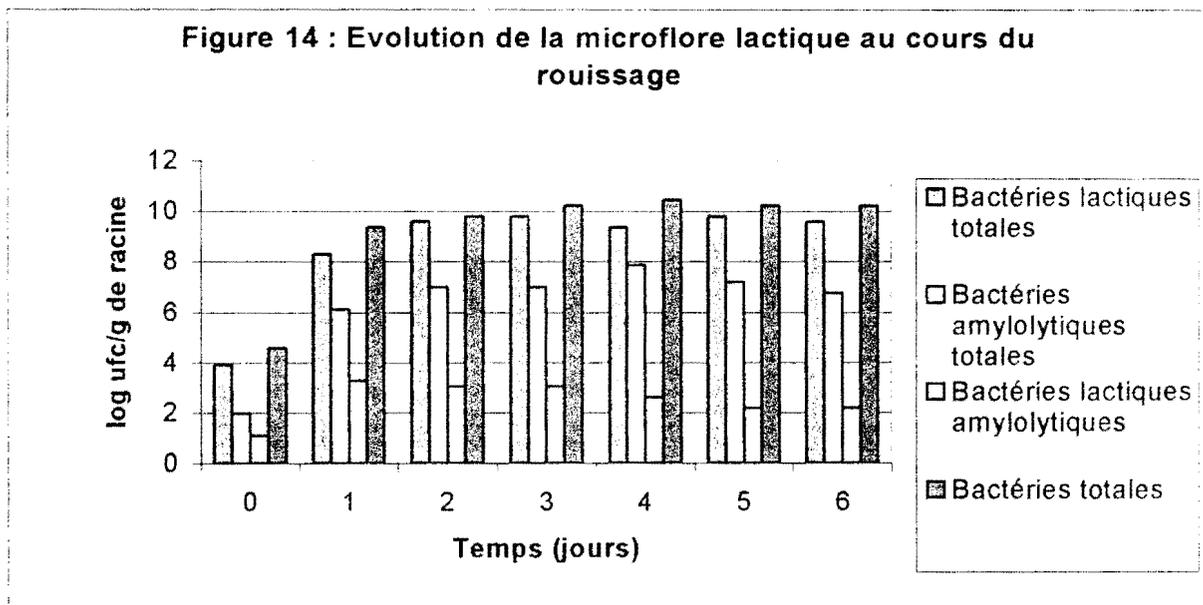
Les résultats relatifs à la microflore totale, aux levures ainsi qu'aux bactéries lactiques, amylolytiques et pectinolytiques sont présentés sur les figures 13 et 14.

La microflore amylolytique est présente pendant tout le rouissage. Son augmentation est très rapide les deux premiers jours. La densité maximale (10^7 bactéries /g de racines) est observée le 4^{ème} jour. Le nombre élevé de ces bactéries pose le problème de l'importance de l'amyolyse pendant le rouissage.



La présence des bactéries pectinolytiques aussi bien aérobies qu'anaérobies est très significative en ce qu'elles contribueraient au ramollissement des tubercules de manioc par la production d'enzymes dégradant la paroi des cellules végétales. Les bactéries pectinolytiques aérobies disparaissent après le troisième jour. Par contre l'augmentation du nombre des bactéries pectinolytiques anaérobies, présentes pendant tout le rouissage, et maximale le troisième jour ; leur croissance comprend une phase semi-stationnaire les jours suivants.

Les moisissures sont présentes uniquement les trois premiers jours et elles sont peu abondantes. Les levures sont dénombrées sur le manioc en rouissage à partir du 2^{ème} jour. Leur population ne devient importante qu'à la fin du rouissage. Les levures et les moisissures pourraient jouer un rôle dans la production des arômes et saveurs de l'aliment fermenté



1.1.4 Caractérisation des microorganismes

Quatre-vingt-quatorze souches de bactéries montrant une activité amyliase révélée par des zones d'hydrolyse sur milieu contenant de l'amidon, ont été identifiées : - 18 sont des bactéries lactiques dont 8 *L. plantarum*, 6 *Lactobacillus spp.* et 4 *Lactococcus spp.* - 68 sont des bacillus dont 12 *B. cereus*, 14 *B. amyloliquefaciens*, 16 *B. polymyxa* - 8 des entérobactéries avec 6 *klebsiella spp.* et 2 *Enterobacter spp.*

L'étude de 102 souches de bactéries pectinolytiques isolées au cours de 72 heures de rouissage, à partir du milieu de culture PFP en double couche, a permis d'identifier 73 Actinomycètes et 29 *Streptococcus spp.* Les levures appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et au genre *Candida*. Il est à noter l'absence d'activités amylolytique et pectinolytique chez les levures isolées.

1.1.5 Identification des bactéries lactiques productrices de linamarase

Parmi les souches de bactéries lactiques possédant une activité linamarasique, on note 26 souches de *Lactococcus lactis*, soit 57% des souches isolées, 19 souches de *Leuconostoc mesenteroides* soit 86%, 2 souches de *Lactobacillus plantarum*, soit 40% et 1 souche de *Lactobacillus sp.* (Tableau 1).

Tableau 1 – Souches bactériennes productrices de β -glucosidase

Nombre de souches		Activité β -glucosidasique ($\mu\text{M}/\text{ml}/\text{mn}$). 10^{-4}	
Étudiées	Productrices de β - glucosidase	Moyenne	Valeurs extrêmes
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactis</i>		
45	26	6,28	0,82-80
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>		
22	19	25,18	0,80-200
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		
5	2	3,08	2,31-3, 86
<i>Lactobacillus sp.</i>			
2	1	1,22	

On doit donc relever la proportion importante de bactéries lactiques ayant la faculté de dégrader la linamarine. Ceci indique que l'élimination des composés cyanogéniques est assurée, au moins en partie, par l'action des enzymes bactériennes.

1.1.6 Résistance des bactéries lactiques au cyanure

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2. Les bactéries lactiques isolées ont une remarquable capacité à résister à de fortes concentrations de cyanure libre par ordre croissant de résistance, on note respectivement : *Lactobacillus coprophilus* (200 ppm), *Lactobacillus delbrueckii* (200 ppm), *Lactobacillus fermentum* (400 ppm), *Leuconostoc mesenteroides* (500 ppm), *Lactobacillus plantarum* (600 ppm) et *Lactococcus lactis* (800 ppm).

Tableau 2- Sensibilité au cyanure des souches de bactéries lactiques

Microorganismes testés	Concentration maximale tolérée (ppm)
<i>Lactobacillus coprophilus</i>	200
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	200
<i>Lactobacillus fermentum</i>	400
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	500
<i>Lactobacillus plantarum</i>	600
<i>Lactococcus lactis</i>	800

Ces bactéries lactiques ont un avantage sélectif par rapport à d'autres.

1.2 VIN DE PALME

1.2.1 Dénombrement des germes

Les populations microbiennes mixtes sont en quantité variable selon les échantillons. Au bout de 24 heures de fermentation de vin frais, on note une diminution de la flore bactérienne totale dans tous les échantillons (Tableau3). Dans le même temps, on observe un

développement rapide des levures (Tableau 3), la baisse du pH consécutive à la fermentation étant favorable à ces dernières.

**Tableau 3 – pH, flores bactérienne et levurienne totales
En début et après 24 heures de fermentation**

Echantillon (N°)	0 heures			24 heures		
	pH	Bactéries (X 10 ⁷ / ml)	levures (X 10 ⁶ / ml)	pH	Bactéries (X 10 ⁷ / ml)	levures (X 10 ⁶ / ml)
1*	3,9	150,0	0,5	3,5	60	27,5
2*	3,8	19,0	1,4	3,5	3,0	4,7
3*	3,4	1,3	1,2	2,8	0,08	60,0
4*	4,1	0,9	1,9	3,8	0,03	50,0
5*	3,7	34,0	20,0	3,5	4,1	26,0
6*	4,0	8,5	6,2	3,8	4,0	12,0
7*	3,9	1,3	4,6	3,8	1,2	10,0
8*	4,2	61,8	4,4	3,8	36,0	17,6
9*	4,8	80,0	5,0	1,0	60,0	29,5
10**	4,3	91,0	7,2	3,9	45,0	25,4
11**	4,1	49,0	9,1	3,7	23,0	36,7
12**	3,9	58,0	3,8	3,5	31,0	18,3

*zone urbaine - ** zone rurale

1.2.2 Identification des germes

195 souches ont été isolées des échantillons de vin des palmiers à huile de la zone urbaine. Les germes suivants ont été identifiés : *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium spp.*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus spp.* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Les 16 souches isolées de vin de palme de la zone rurale comprennent les microorganismes ci-après : *Bacillus subtilis*, *Corynebactérium*,

Hanseniaspora guilliermondii, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus spp.*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*. Le tableau 4 donne la fréquence des germes isolés. Il faut noter que les échantillons d'origines urbaine et rurale renferment pratiquement les mêmes bactéries avec les exceptions suivantes : *B. sphaericus* et *B. pumilus* sont présents uniquement dans le vin récolté en ville ; *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pseudomonas fluorescens* n'existent que dans la boisson d'origine rurale. Les *Zymomonas* et les *Lactobacillus* sont absents des échantillons d'origines urbaine et rurale ; deux types de levures, *Saccharomyces cerevisiae* et *Hanseniaspora guilliermondii*, y sont présents.

Parmi les microorganismes identifiés, seuls paraissent importants par leur rôle *Lactococcus lactis* et *Saccharomyces cerevisiae*. Le rôle des autres germes (*Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Hanseniaspora*) reste à préciser.

Tableau 4 – Microflore du vin de palme

Microorganismes	Nombre d'isolats	
	Vin ZU	Vin ZR
<i>Bacillus subtilis</i>	39	5
<i>Bacillus sphaericus</i>	13	0
<i>Bacillus pumilus</i>	13	0
<i>Corynebacterium</i>	39	2
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	0	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13	1
<i>Staphylococcus spp</i>	0	3
<i>Streptococcus spp</i>	52	0
<i>Strept. Lactis subsp. diacetylactis</i>	26	13
Total	195	26

ZU : zone urbaine – ZR : zone rurale

1.3 PATE FERMENTEE DE MAÏS « POTO-POTO »

1.3.1 Evolution des populations microbiennes

L'évolution des principaux groupes de microorganismes caractérisés au cours du processus de fermentation est représentée sur les figures 15 et 16.

Figure 15 : Concentration des bactéries lactiques et des entérobactéries

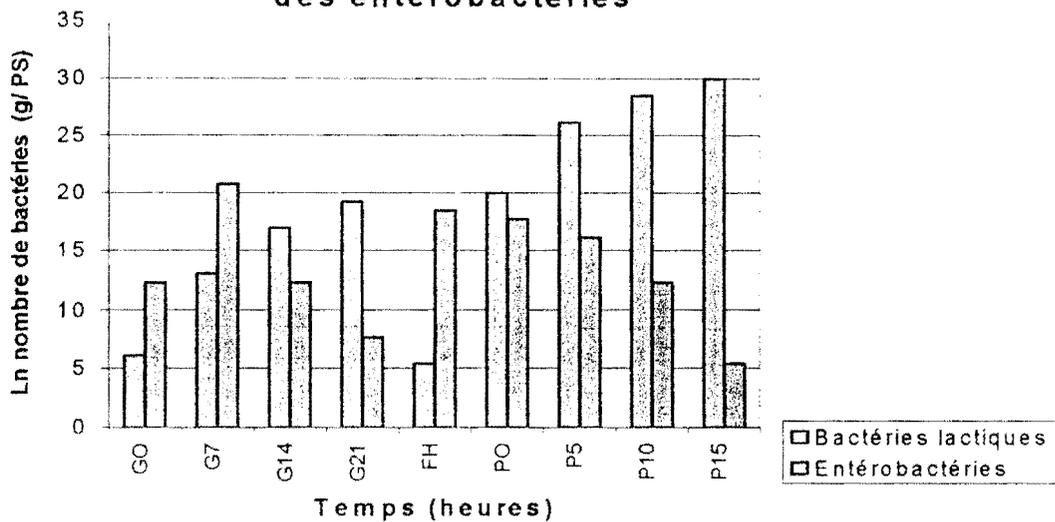
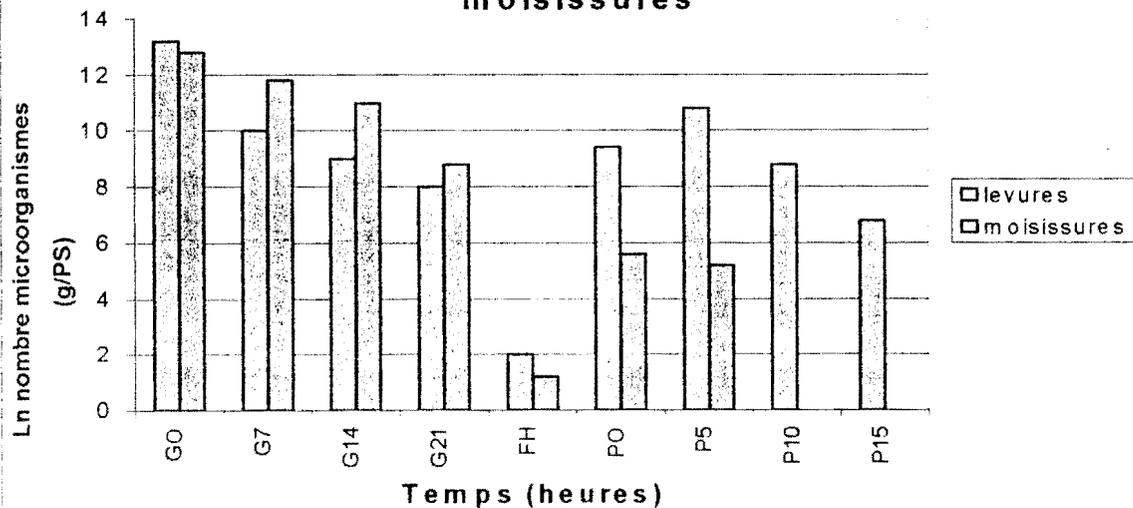


Figure 16 : Concentration des levures et moisissures



1.3.2 Bactéries lactiques

Leur concentration est de $4,6 \cdot 10^2$ bact. /g PS au moment du trempage. Cette population augmente progressivement au cours de cette phase ; sa valeur maximale est de $2,5 \cdot 10^8$ bact. /g PS à G21 (grains de maïs trempés pendant 21 heures). Pendant l'étape de broyage, on observe une forte diminution de cette population ($2,1 \cdot 10^2$ bact. /g PS).

Pendant la décantation, l'augmentation de la population lactique est très importante ($6,2 \cdot 10^{12}$ bact. /g PS). L'évolution de la quantité des bactéries lactiques est en accord avec l'acidification du milieu et la diminution de la pression d'O₂ (figure 25)

1.3.3 Entérobactéries

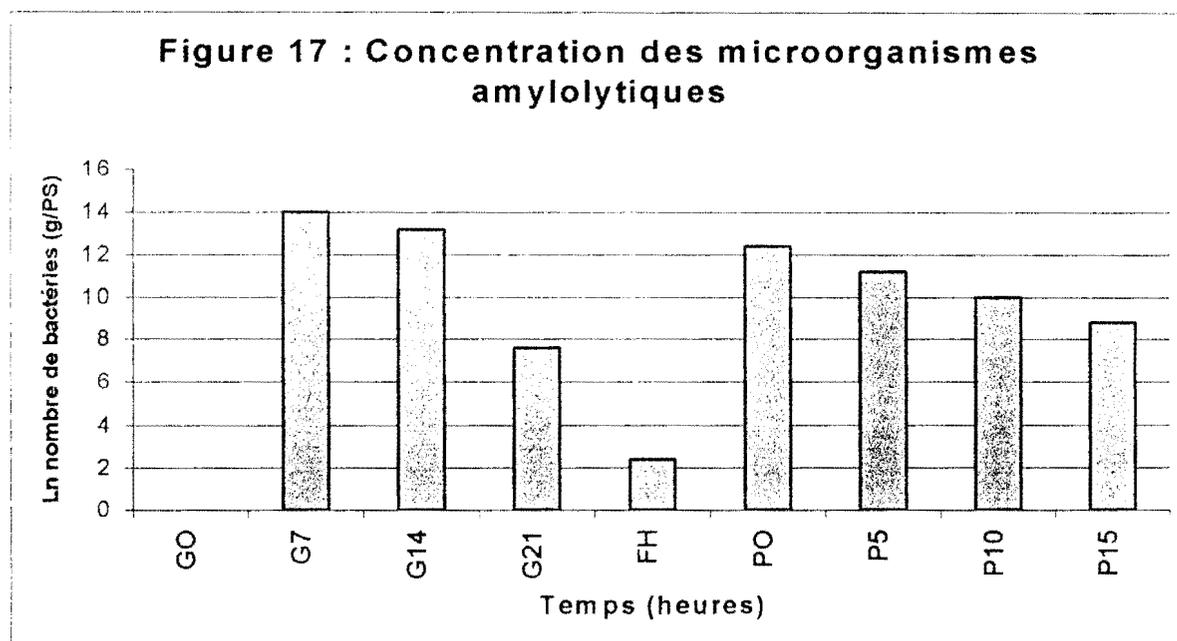
Leur évolution est contraire à celle des bactéries lactiques : au cours du trempage, après une augmentation rapide (de $10,5$ à $97 \cdot 10^8$ bact. /g PS), leur nombre décroît jusqu'à $1,2 \cdot 10^3$ bact. /g PS. Une augmentation de la population est observée ensuite après broyage. Pendant la décantation, cette population diminue avec la baisse du pH (figure 15) et l'augmentation du nombre des bactéries lactiques.

1.3.4 Levures et moisissures

Leur nombre au moment du trempage est respectivement de 10^6 et 10^7 par g PS. Cette microflore diminue progressivement et disparaît dans la farine humide (FH). Elle réapparaît au cours de la décantation. Les levures deviennent abondantes dans la pâte après 5 heures de décantation (P5) et décroissent ensuite tandis que les moisissures disparaissent ultérieurement.

1.3.5 Flore amylolytique

Elle est très importante après 7 heures de trempage des grains (G7) (figure 17), mais décroît au cours du trempage ($5,8 \cdot 10^5$ à $1,9 \cdot 10^3$ bact. /g PS). Pendant la décantation, leur nombre, élevé au départ (PO) diminue également par la suite ($3 \cdot 10^5$ à $5,9 \cdot 10^3$ bact. /g PS).



1.4 FEUILLES DE MANIOC

1.4.1 Evolution de la population microbienne

Pendant la fermentation, la microflore totale s'accroît et elle est quantitativement importante. Par contre, la population de bactéries lactiques en augmentation cesse de croître au bout de 24 heures de fermentation et diminue par la suite. La proportion de la flore lactique par rapport à la flore totale chute très fortement, de 65% à 4%, lors que celle de la flore non lactique augmente, de 34,97% au début de la fermentation à 95, 92% à la fin (figures 18 et 19)

Figure 18 - Evolution des microflore totale et lactique

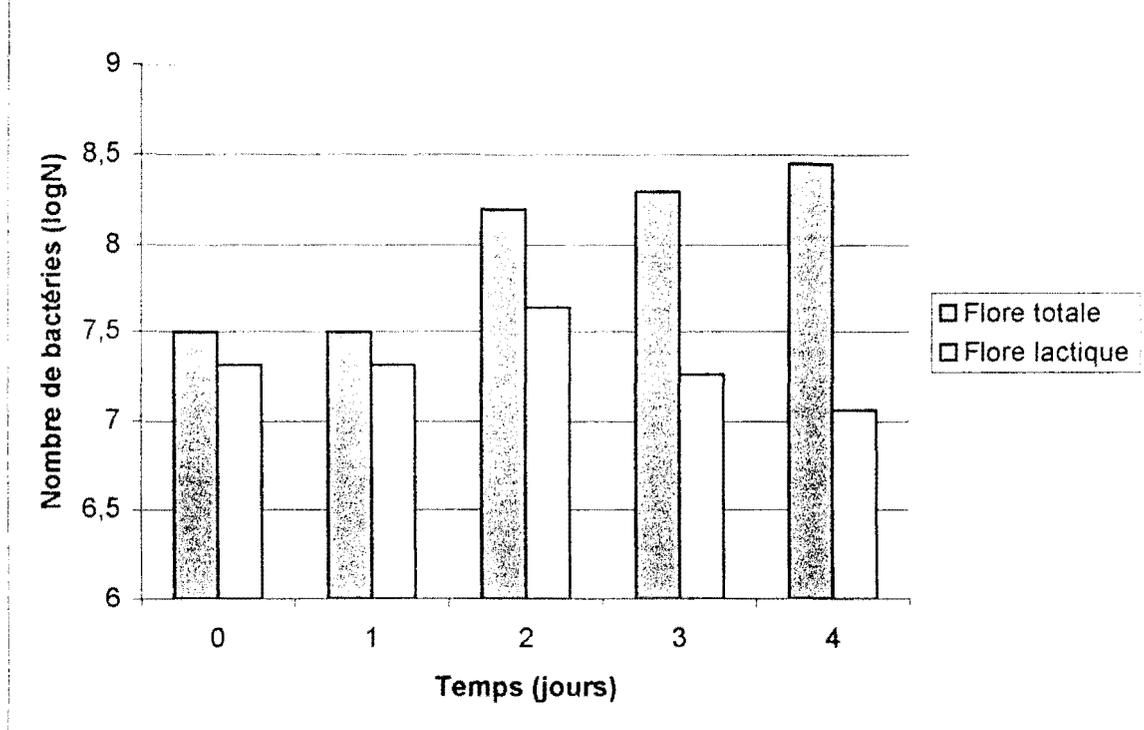
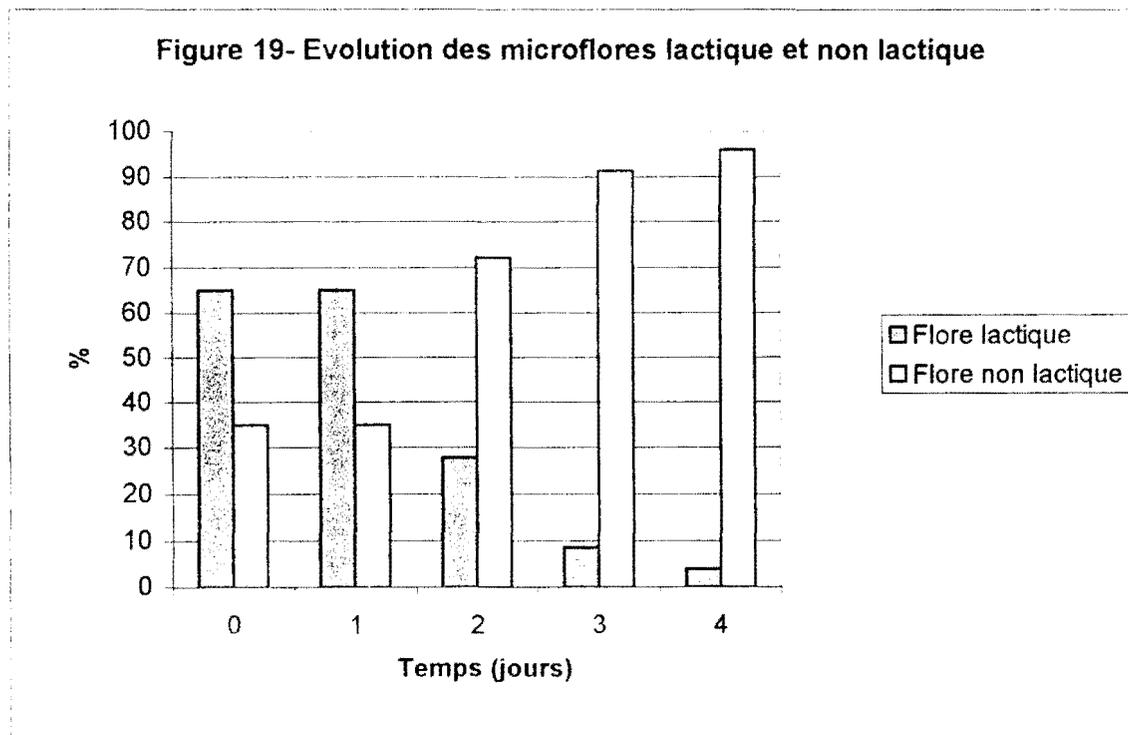
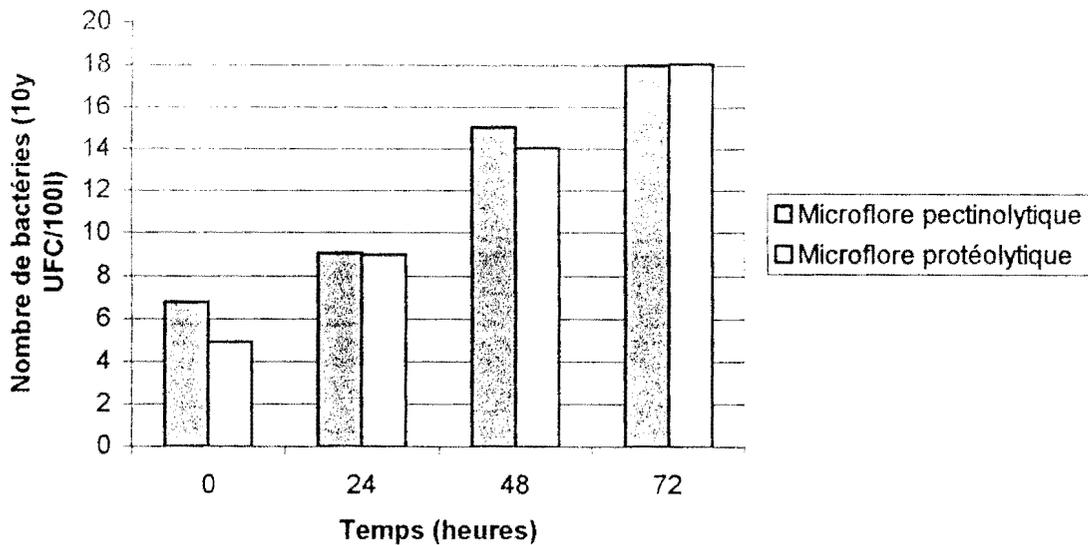


Figure 19- Evolution des microflore lactique et non lactique



Par ailleurs, les microflore pectinolytiques et protéolytiques augmentent pendant la fermentation des feuilles de manioc (figure 20)

Figure 20 - Evolution des microflore pectinolytique et protéolytique



1.4.2. Identification de la population microbienne.

Les microorganismes des feuilles de manioc en cours de transformation sont composés essentiellement de bactéries lactiques et non lactiques. Les bactéries non lactiques comprennent : *Acinetobacter calco aceticus*, *Agrobacterium radiobacter*, *Erwinia spp*, *Micrococcus varians*, *Staphylococcus sciuri* ; *Staphylococcus xylosus*. Les bactéries lactiques présentes sont : *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus macerans* (86), *Lactobacillus plantarum* , *Lactobacillus fermentum* , *Lactobacillus spp*, *Lactococcus lactis diacetylactis*, *Pediococcus cerevisiae*.

Trente souches ont été isolées et purifiées. Parmi celles-ci 19 (soit 64%) sont à la fois pectinolytiques et protéolytiques et 11 (soit 36%) sont uniquement pectinolytiques (photos 1 et 2). L'observation de ces souches montre des bâtonnets sporulés, à spore non déformante.

L'identification de dix de ces trente souches avec les galeries API 50 CHB et API 20 E montre l'appartenance de ces souches au genre *Bacillus*

Tableau 5 : Identification présumptive de quelques souches microbiennes isolées du « ntoba mbodi »

Souches isolées (S)	Identification présumptive
S1 *	<i>Bacillus circulans</i> 1 <i>B. circulans</i> 2 <i>B. macerans</i>
S2 **	<i>Bacillus subtilis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. pumilus</i>
S3 **	<i>Bacillus polymyxa</i> <i>B. megaterium</i>
S4 **	<i>Bacillus ssp</i>
S5 **	<i>Bacillus pumilus</i>
S6 *	<i>Bacillus sphaericus</i> <i>B. brevis</i>
S7 *	<i>Bacillus ssp</i>
S8 **	<i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i>
S9 *	<i>Bacillus ssp</i>
S10 *	<i>Bacillus ssp</i>

* Souche ayant uniquement l'activité pectinolytique

** Souche ayant à la fois l'activité pectinolytique et protéolytique

2 SOUPLESSE DU METABOLISME ET DIVERSITE DE COMPOSES PRODUITS

2.1 VIN DE PALME

2.1.1. Evolution du pH et de l'acidité totale.

Les valeurs de pH sont relativement faibles et restent pratiquement constantes (moins d'une unité de variation) au cours de la fermentation (Tableau 6 a).

Tableau 6 a– Evolution au cours de la fermentation du pH moyenne et écart type)

Temps (heures)	pH
0	4,42 (0,52)
3	4,27 (0,38)
6	4,16 (0,31)
9	4,06 (0,30)
12	4,06 (0,30)

L'acidité totale augmente également très faiblement au cours du temps (Tableau 6 b). Les différentes valeurs du pH et de l'acidité confirment le caractère aigrelet de la boisson.

Tableau 6 b– Evolution au cours de la fermentation de l'acidité totale (moyenne et écart type)

Temps (heures)	Acidité (g d'acide lactique/ l)	
0	5,10	(1,95)
1	5,42	(1,82)
2	5,72	(1,79)
3	5,84	(1,78)
4	5,96	(1,87)
5	6,42	(1,80)
6	6,66	(1,70)
7	6,84	(1,75)
8	6,96	(1,73)

2.1.2 Evolution des sucres réducteurs

La teneur en sucres réducteurs (Tableau 7) apparaît constante pendant les six premières heures. Au-delà, on constate une diminution de leur concentration.

2.1.3 Production de métabolites

Les composés organiques identifiés pendant la fermentation sont essentiellement l'acide acétique, l'acide isobutyrique, l'acide isovalérique et l'éthanol. A l'exception de l'acide isovalérique dont la concentration reste constante, la teneur des autres produits augmente (Tableau 7), celle des sucres réducteurs diminue.

Tableau 7- Evolution des concentrations (moyenne et écart-type) de différents métabolites au cours de la fermentation

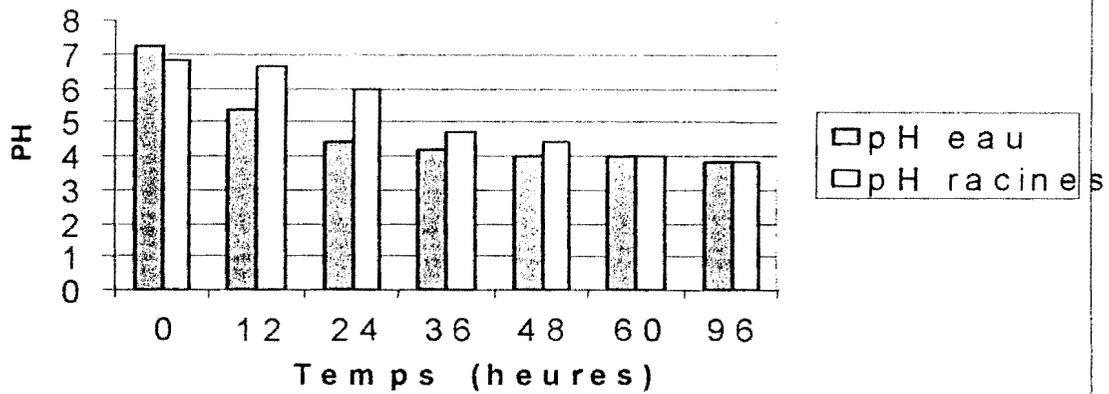
ps res)	Acide acétique	Acide isobutyrique	Acide isovalérique	Ethanol	Sucres réducteurs
0	2,68 (1,09)	0,59 (0,06)	0,34 (0,07)	1,33 (0,10)	0,50 (0,03)
3	3,056 (1,06)	0,45 (0,19)	0,45 (0,08)	1,23 (0,08)	0,50 (0,02)
6	3,06 (1,03)	0,95 (0,38)	0,45 (0,08)	2,38 (0,2)	0,49 (0,03)
9	3,55 (1,06)	0,89 (0,33)	0,56 (0,07)	2,29 (0,17)	0,37 (0,02)
12	3,95 (1,51)	0,91 (0,33)	0,42 (0,09)	3,27 (0,32)	0,30 (0,01)

2.2 TUBERCULES ROUIS DE MANIOC

2.2.1 Evolution du pH

On observe dans la figure 21 une diminution rapide (dès la 12^{ème} heure) et importante du pH de l'eau de rouissage : de 7, 2 à 3,8. L'abaissement du pH des racines de manioc est tout aussi important, mais il débute un peu plus tard (à partir de la 24^{ème} heure).

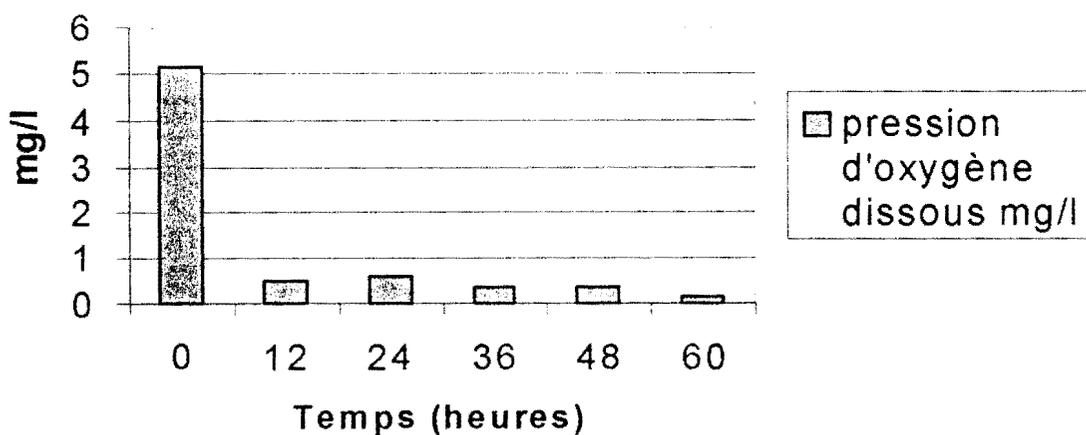
Figure 21 - Evolution du pH au cours du rouissage



2.2.2 Evolution de la teneur en oxygène dissous

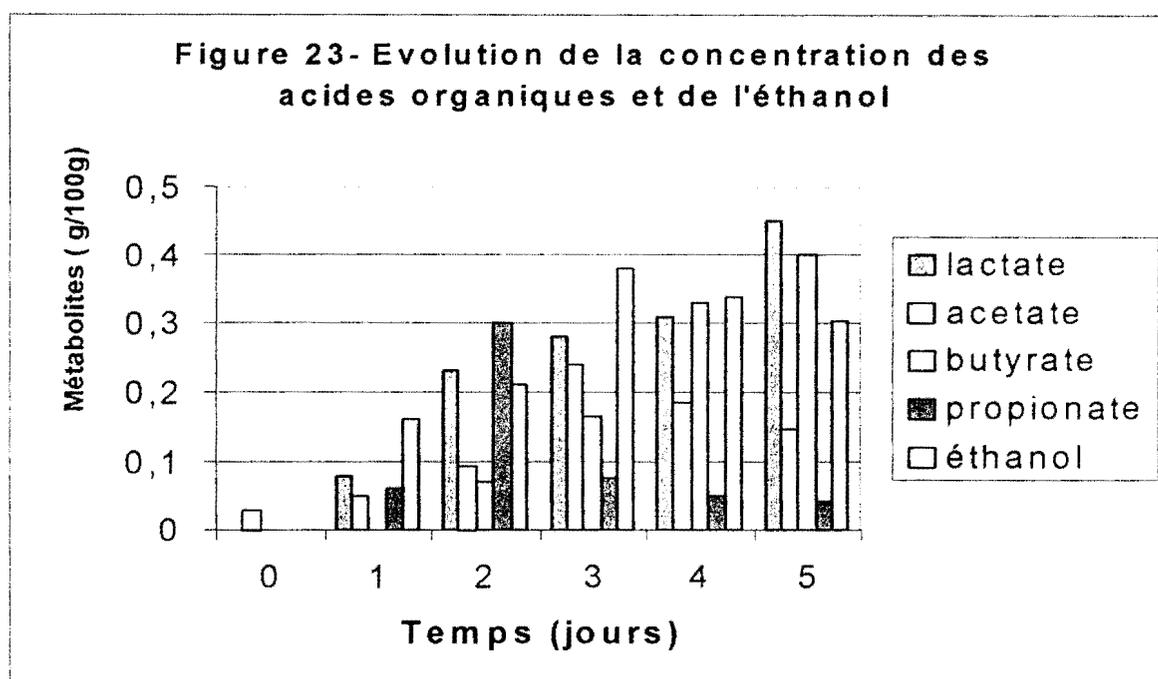
La pression d'oxygène dissous baisse fortement après 12 heures de fermentation. Elle décroît de 5,2 à 0,05 mg/l. Cette valeur reste constante jusqu'à la fin du rouissage (figure 22). La fermentation des tubercules de manioc se déroule en milieu ayant une faible teneur en oxygène.

Figure 22- Evolution de la pression d'oxygène dissous



2.2.3 Evolution de l'éthanol et des acides organiques

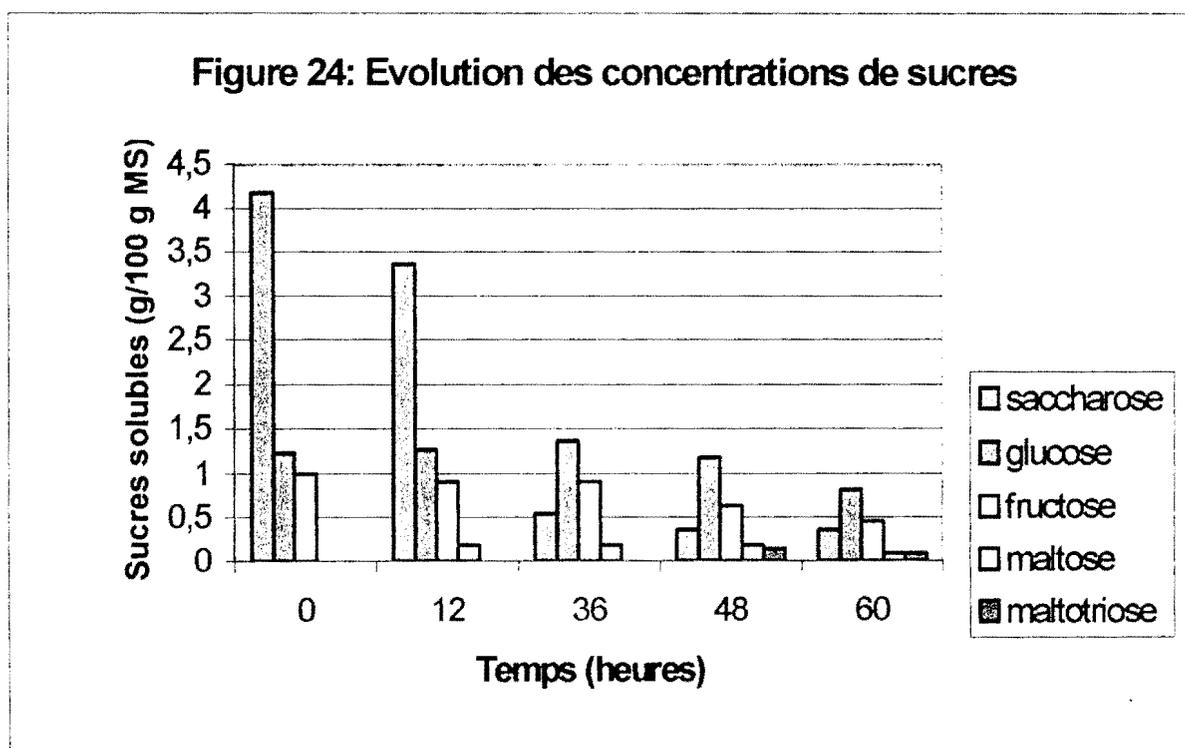
L'éthanol et les acides lactique, acétique, propionique et butyrique sont les principaux composés organiques identifiés au cours du rouissage (figure 23)



Les acides lactique et butyrique sont quantitativement les métabolites les plus abondants. Leur concentration augmente pendant le rouissage. L'acide butyrique n'apparaît qu'à partir 2^{ème} jour. L'acide propionique est à l'état de traces à la fin de la fermentation. La concentration d'acide acétique augmente régulièrement jusqu'au 3^{ème} jour et diminue ensuite. La concentration de l'éthanol augmente régulièrement pour devenir maximale au 3^{ème} jour. Elle baisse par la suite mais elle reste importante en fin de fermentation. La courbe de production de l'éthanol semble être en rapport avec la courbe de croissance des levures

2.2.4 Evolution des sucres

En ce qui concerne les sucres, on observe (figure 24) une disparition significative des sucres fermentescibles, notamment le saccharose. Ces sucres sont vraisemblablement assimilés ou fermentés. Le maltose et le maltotriose, produits de l'hydrolyse de l'amidon, sont présents en très faibles quantités. Ce fait indique la faible activité amylolytique du rouissage.



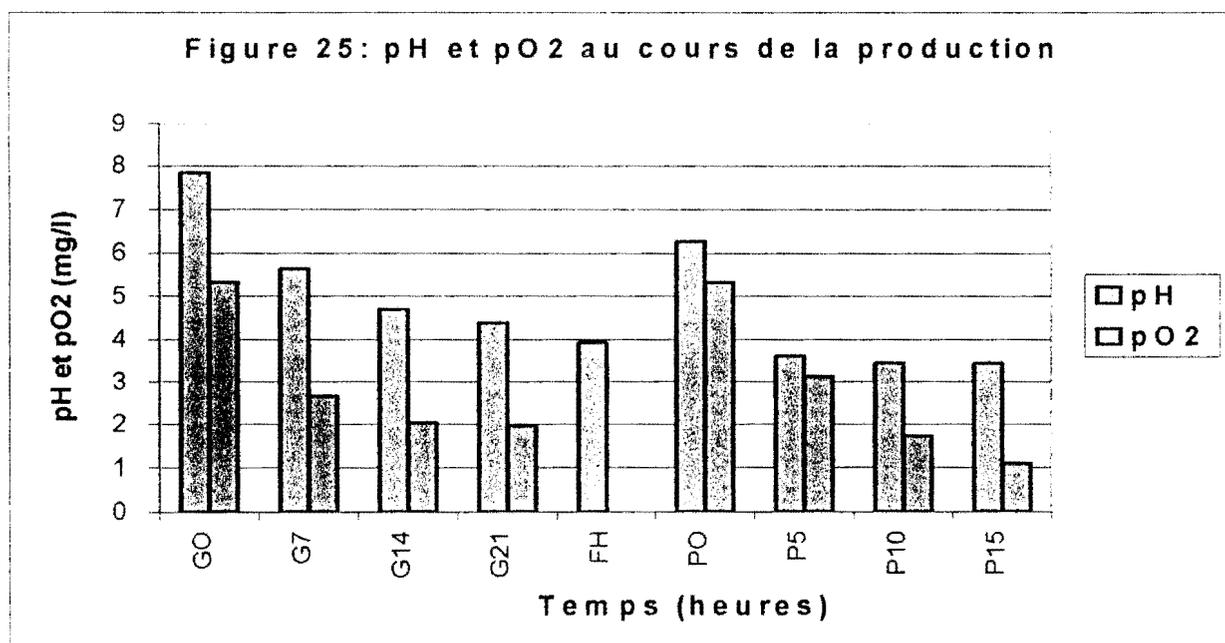
2.3 PATE FERMENTEE DE MAÏS « POTO- POTO »

2.3.1 pH

Au cours du trempage (figure 25), le pH baisse fortement : il passe de 7,6 à 4,4. Après défibrage à l'eau courante, il remonte à 6,4. Pendant la décantation, on observe une nouvelle diminution très rapide du pH à 3,5.

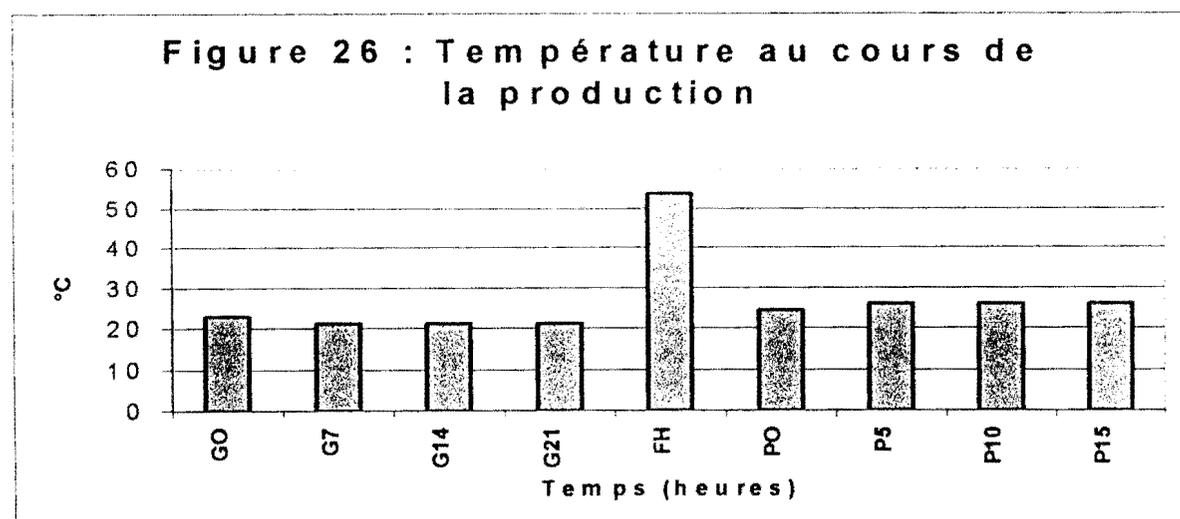
2.3.2 Oxygène dissous

La pO_2 présente les mêmes variations (figure 25) : elle passe de 5,4 mg/l à 2 mg/l pendant le trempage. Elle remonte à 5,4 mg/l au cours du défibrage et baisse à nouveau à 1,1 mg/l à la fin de la décantation.



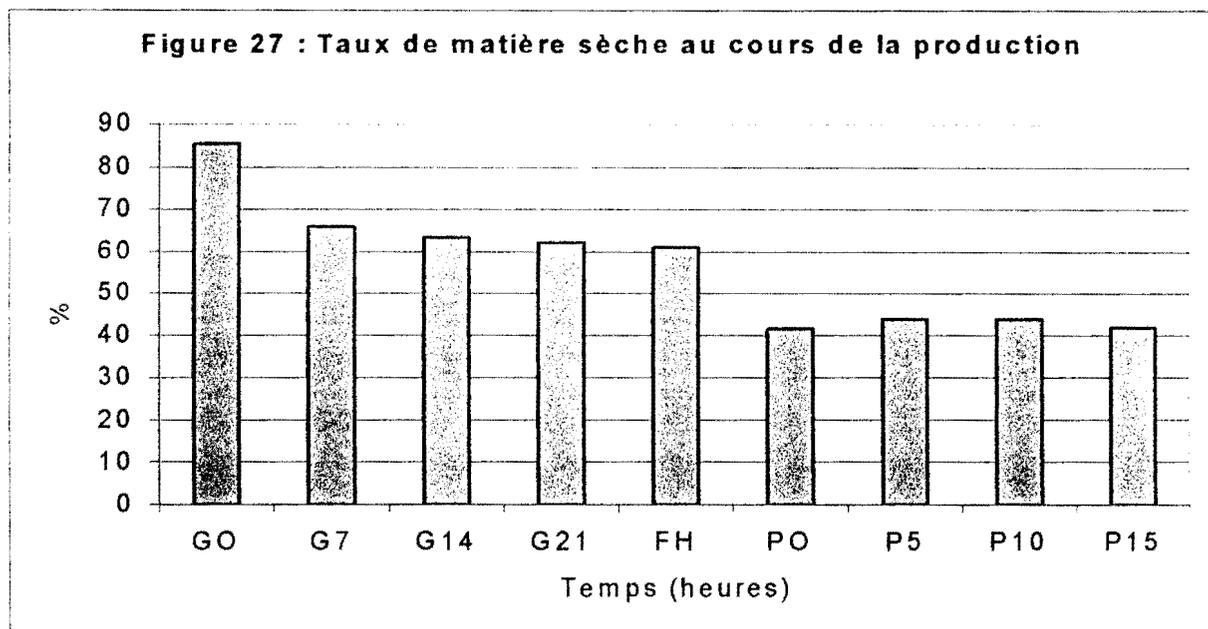
2.3.3 Température

Elle reste relativement stable au cours du trempage (23°C) et de la décantation (27°C). La différence de température observée entre ces deux étapes pourrait traduire une différence dans le niveau d'activité fermentaire. A l'étape du broyage, sa valeur s'élève à $56,5^\circ$ (figure 26)



2.3.4 Matière sèche

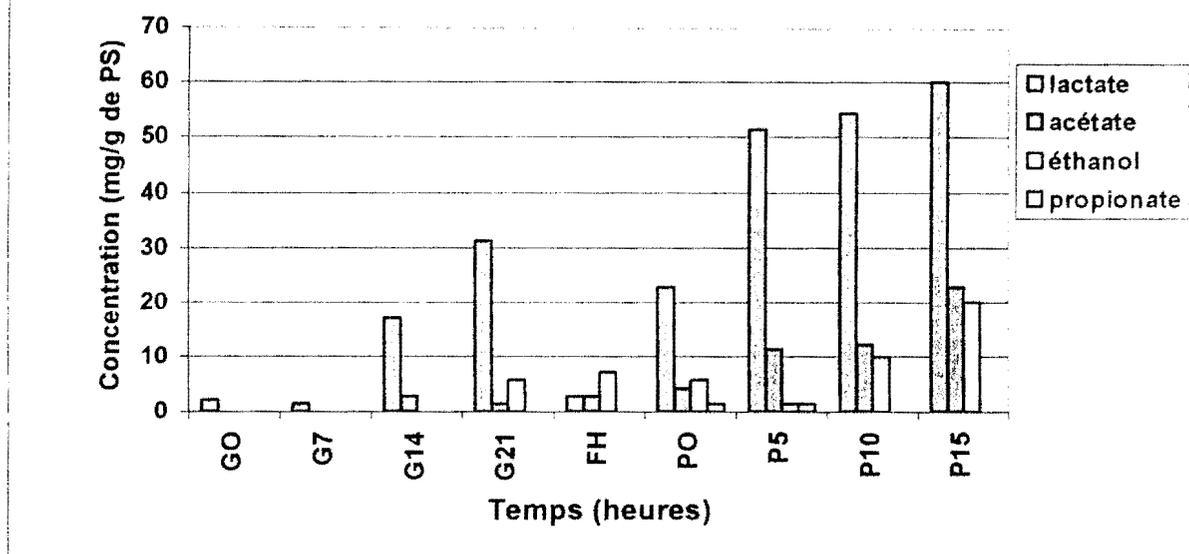
La transformation du maïs en pâte s'accompagne d'une perte de matière sèche (figure 27). Sa valeur passe de 86 à 63 % pendant le trempage et de 63 % à 41 % après broyage, défibrage et décantation.



2.3.5 Acides organiques

Le lactate constitue le produit le plus important de la fermentation à côté des acides acétique et propionique (figure 28).

Figure 28 : Taux de composés organiques au cours de la production



2.3.6 Sucres et alcools

Les concentrations en fructose et glucose diminuent faiblement au cours de la première étape (trempage). Pendant la décantation, tout le fructose est consommé et le glucose reste le seul sucre présent, bien qu'en quantité faible (figure 29). Les concentrations des polyosides intermédiaires (maltopentose, maltohexose, maltoheptose, maltotriose, maltose), caractéristiques de la dégradation de l'amidon sont faibles. On ne retrouve plus de maltose ni de maltotriose dans la pâte en décantation (figure 30).

L'éthanol est le seul alcool identifié (figure 28). Sa teneur augmente au cours du processus.

Figure 29: Concentration du glucose et du fructose

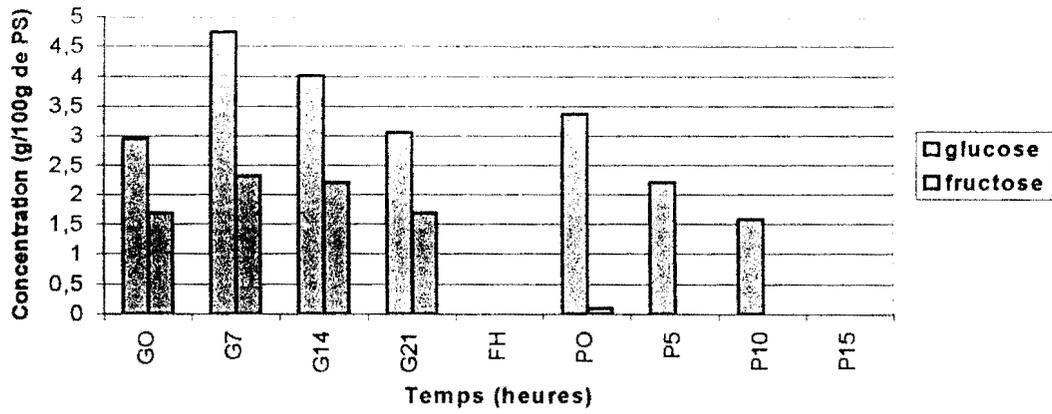
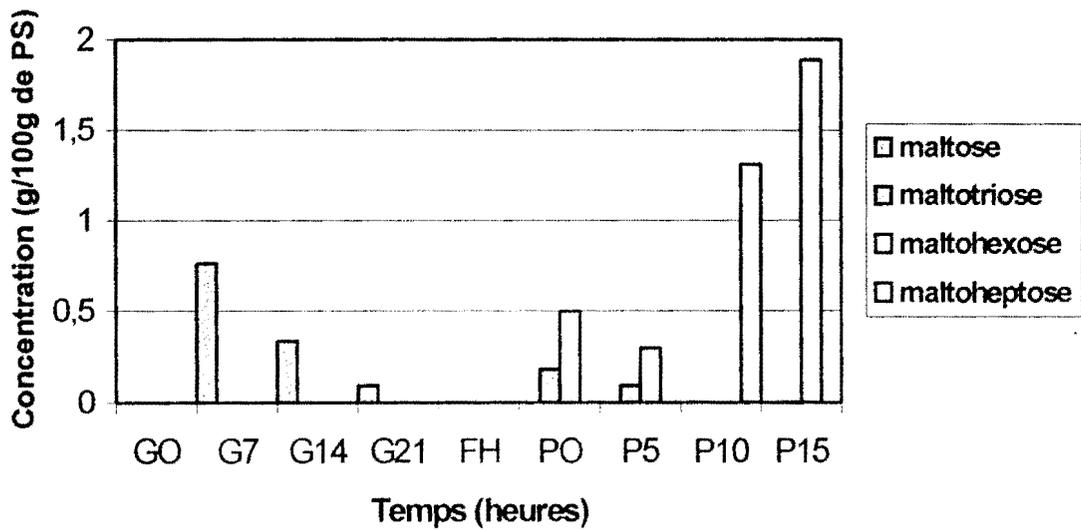


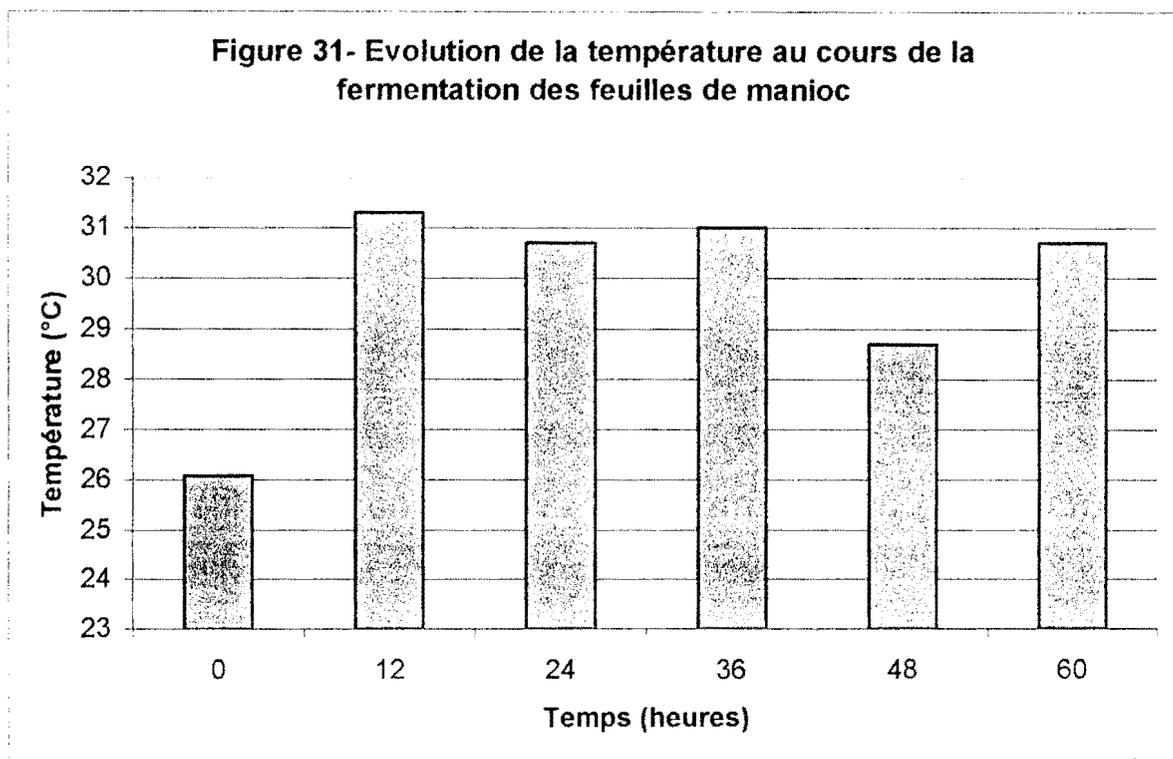
Figure 30: Concentration de glucides



2.4 FEUILLES DE MANIOC

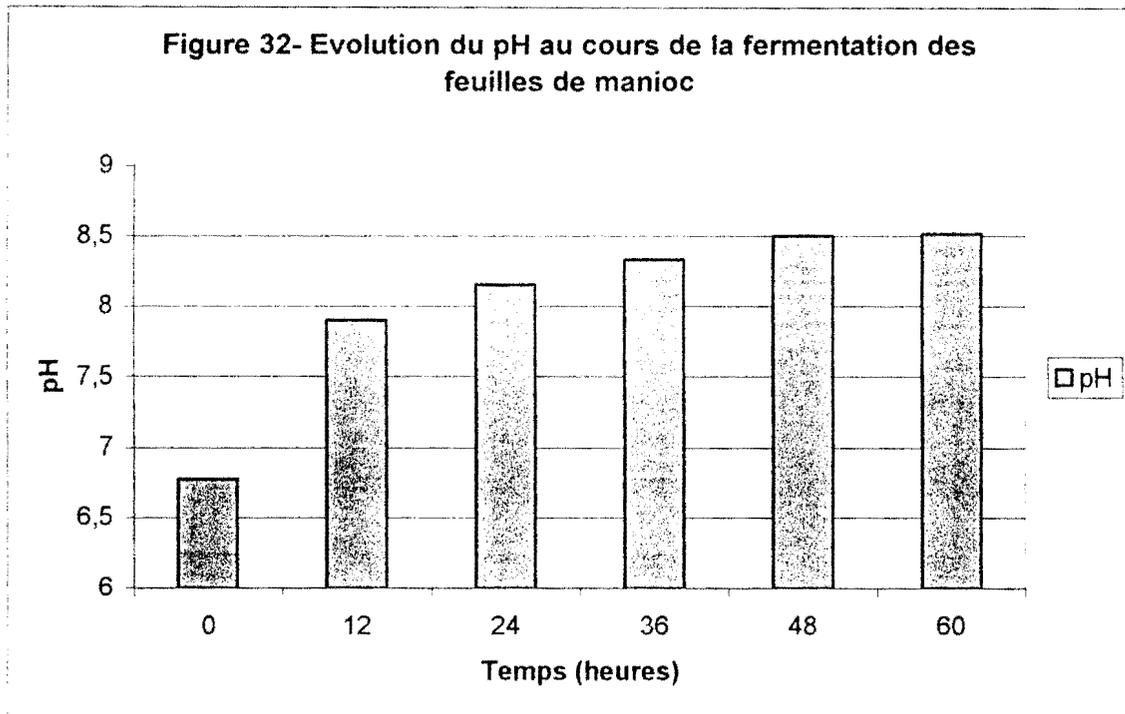
2.4.1 Evolution de la température au cours de la fermentation des feuilles de manioc

La température autour de 26°C au début de la fermentation s'accroît dans les 12 premières heures pour atteindre la valeur de 31°C puis elle diminue pour le reste de la fermentation (figure 31).



2.4.2 Evolution du pH au cours de la fermentation des feuilles de manioc.

Le pH, environ 6,5 au début de la fermentation, augmente fortement dans les 12 premières heures et devient basique (pH 8,1) au bout de 24 heures de fermentation (figure 32). Le niveau de pH élevé (pH 8,5) en fin de fermentation devrait améliorer le clivage des cyanohydrines en acide cyanhydrique volatil.



2.4.3 Acidité titrable

L'acidité titrable diminue au cours de la fermentation (figure 33), ce qui traduit la synthèse des composés aminés basiques.

La figure 34 montre une forte augmentation des composés phénoliques entre 24 et 48 heures de fermentation. Par la suite, la concentration de ces composés décroît aussi fortement, indiquant ainsi leur dégradation.

Figure 33: Evolution de l'acidité titrable au cours de la fermentation des feuilles de manioc

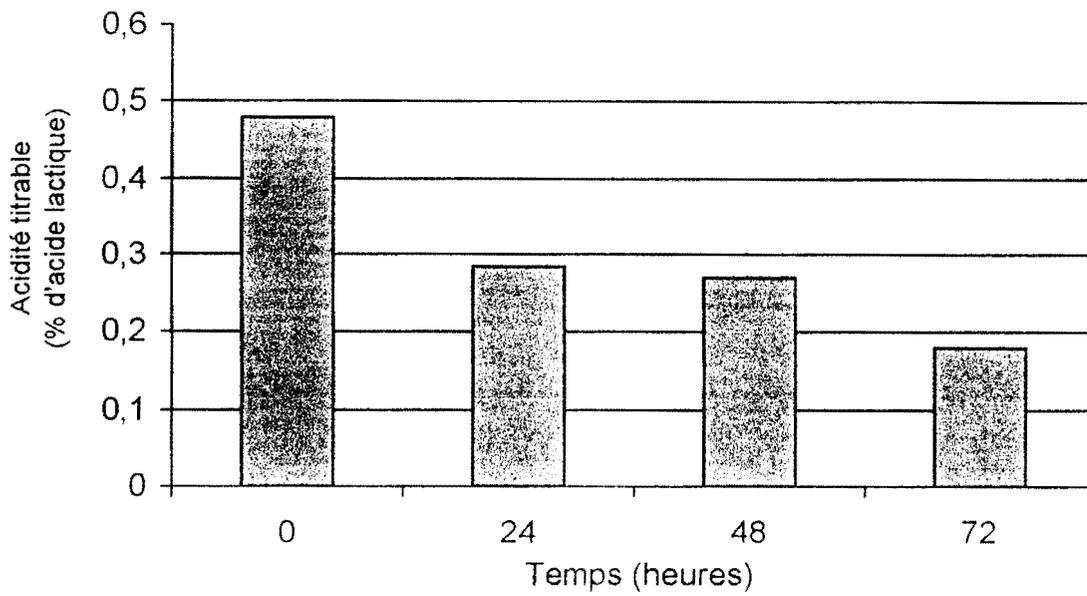
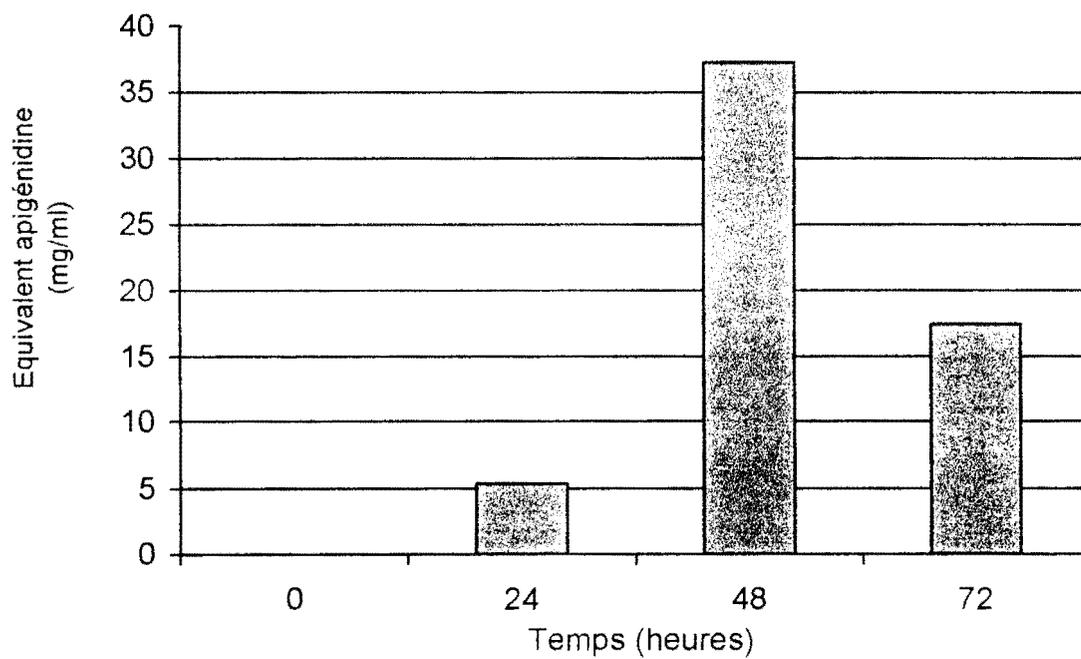


Figure 34: Evolution de la concentration des composés phénoliques au cours de la fermentation des feuilles de manioc



2.4.4 Evolution des acides organiques et de l'éthanol

Au cours de la fermentation des feuilles de manioc, malgré le pH alcalin, la quantité des acides lactique et acétique augmente (Tableau 8). Par contre, l'acide propionique absent au début de la fermentation apparaît en de fin fermentation. Quant à l'éthanol, il apparaît momentanément en cours de fermentation.

Tableau 8 : Evolution des acides organiques et de l'éthanol au cours de la fermentation des feuilles de manioc.

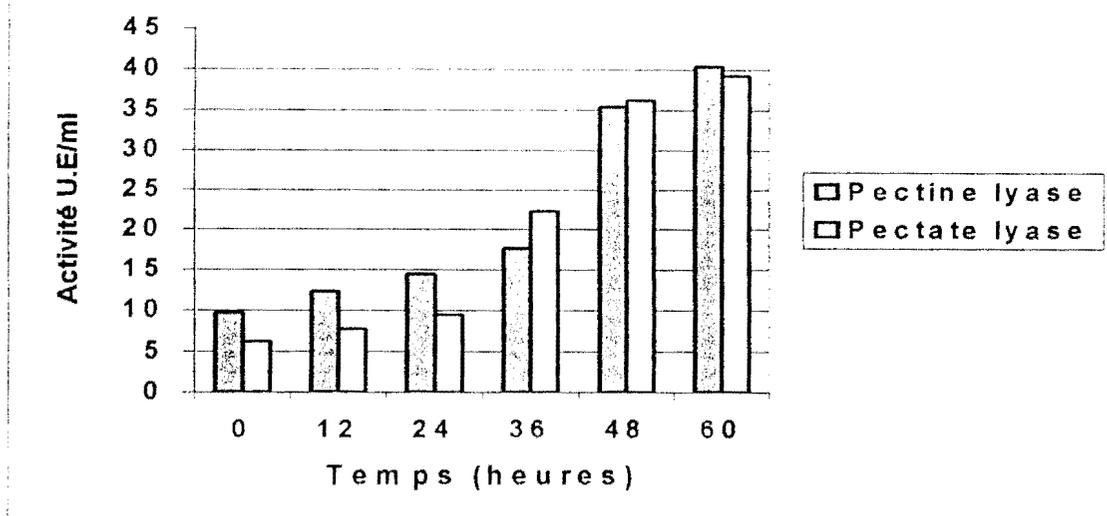
Temps (heure)	Acide lactique g / l	Acide acétique g / l	Acide propionique g / l	Ethanol g / l
0	0,11	0,49	-	-
24	1,24	1,19	-	0,32
60	8,00	2,71	0,79	-

La concentration des composés phénoliques augmente fortement après 24 heures avec un maximum à 48 heures. Par la suite, elle diminue, indiquant une dégradation de ces composés phénoliques.

2.4.5 Dosage des pectine et pectate lyases

Durant la fermentation des feuilles de manioc, l'activité des enzymes pectinolytiques, pectate et pectine lyases, a été détectée au début. Elle augmente d'abord faiblement puis fortement après 24 heures de fermentation pour atteindre le maximum à la 60ème heure comme le montre la figure 35. Les deux courbes ont un profil identique.

Figure 35 - Evolution de l'activité des pectine et pectate lyases au cours de la fermentation des feuilles de manioc



2.4.6 Mise en évidence des activités protéolytiques au cours de la fermentation des feuilles de manioc.

Les zones claires observées autour des colonies révèlent la présence de l'activité protéolytique dans les feuilles non stérilisées (Figures 36 et 37). Ces zones claires sont absentes dans le cas des feuilles stérilisées ; cela traduit l'absence de l'activité protéolytique



Figure 36 : Présence de l'activité enzymatique

Zone claire autour de la souche = présence de l'activité recherchée (2 puits en haut)

Absence de zone claire = absence de l'activité recherchée (2 puits en bas)

Gauche : activité pectine lyase – Centre : activité pectate lyase- Droite :
 activité protéolytique zone claire autour d'une souche

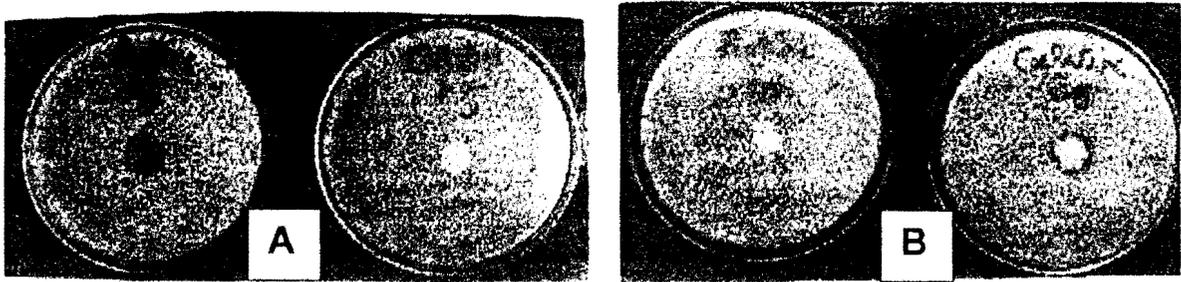


Figure 37 : Présence de l'activité pectinolytique et protéolytique

A : souche présentant uniquement l'activité pectinolytique

B : souche présentant à la fois l'activité pectinolytique et protéolytique

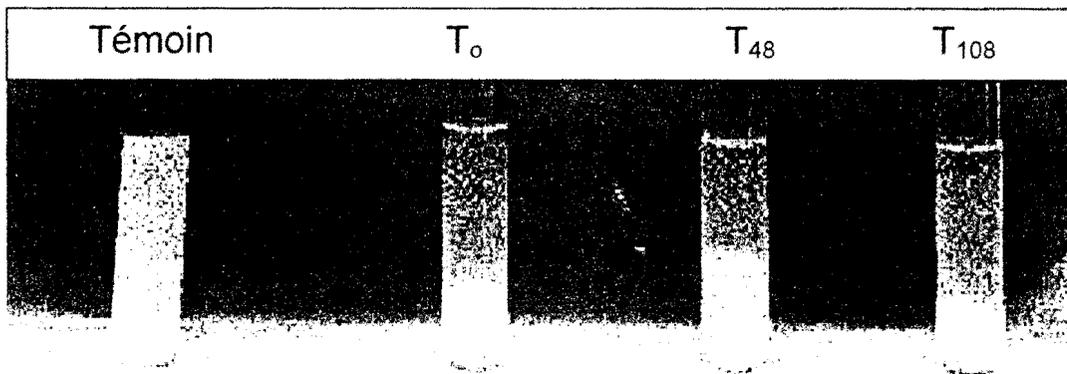


Figure 38 : Dégradation de l'ovalbumine coagulée

Témoin : milieu opaque = absence d'activité protéolytique

T₀, T₄₈, T₁₀₈ : clarification du milieu = présence d'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été également mise en évidence à partir du jus de feuilles fermentées de manioc. En effet, le milieu opaque contenant l'ovalbumine coagulée se clarifie après incubation avec un extrait de ce jus. Cette clarification traduit l'hydrolyse de l'ovalbumine (Figure 38).

3 CHANGEMENTS PHYSICOCHIMIQUES DE TEXTURE, DE COULEUR ET DE REFRACTION

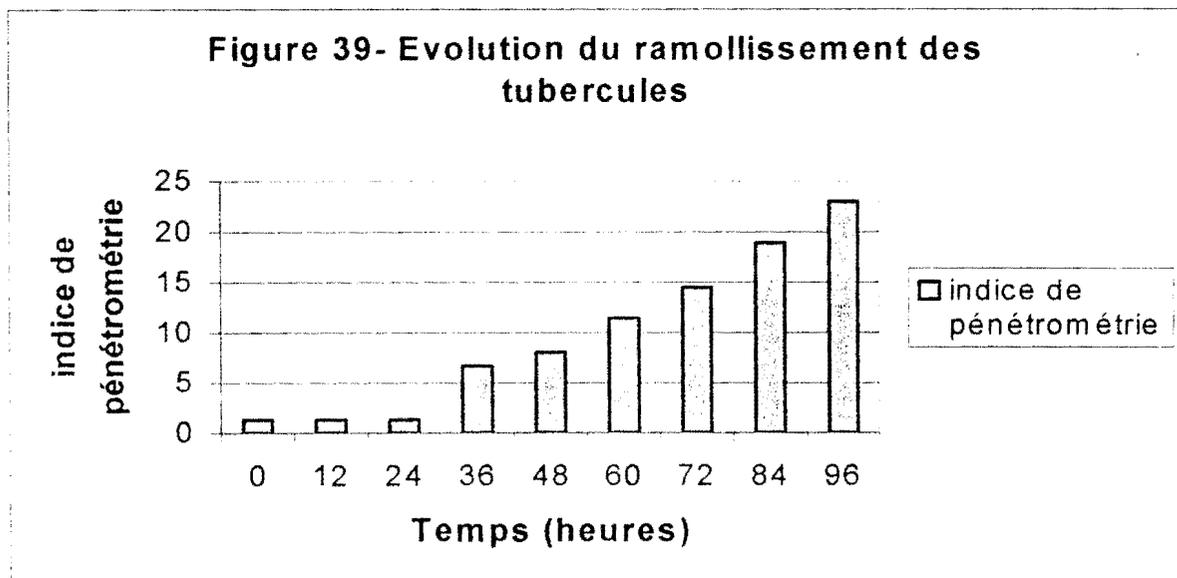
3.1 Changement de texture : ramollissement

Le changement de texture est marqué par le ramollissement des tubercules et des feuilles de manioc accompli sous l'action combinée des enzymes pectinolytiques d'origine microbienne et végétale, notamment les pectine et pectate lyases

a) Tubercules de manioc

La courbe d'évolution de l'indice de pénétrométrie qui caractérise le ramollissement est représentée à la figure 39.

Le diagramme montre deux phases : une phase de latence de 24 heures et une phase d'accélération de ramollissement des tubercules à partir de la 24^{ème} heure de fermentation indiquant que le phénomène est progressif. A la 96^{ème} heure, l'indice de pénétrométrie est de 22,97. Ceci correspond à un ramollissement important.



b) Feuilles de manioc

Seuls les essais 2 et 4, réalisés avec les feuilles de manioc non stériles, donnent le produit attendu. En effet, au bout de 4 jours de fermentation, la couleur, la texture et l'odeur des feuilles changent. Celles-ci deviennent vert sombre, se ramollissent (figure 40)

caractéristique du « *ntoba mbodi* ». Les tests d'évaluation (tableau 9) par un panel de producteurs confirment ces résultats.

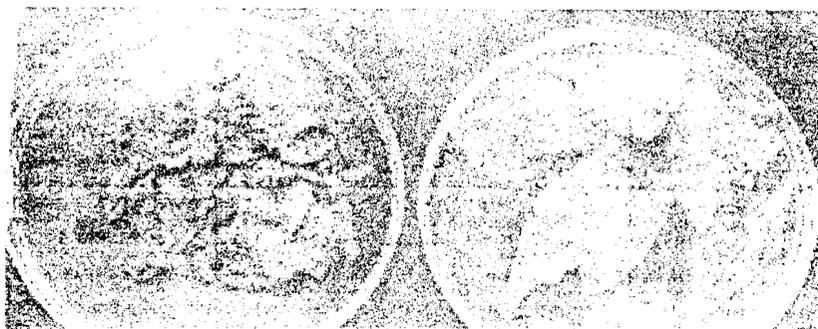


Figure 40 : Ramollissement des feuilles fermentées de manioc

Gauche : feuilles ramollies = feuilles non stérilisées

Droite : feuilles entières = feuilles stérilisées

Tableau 9. Evaluation par un panel de producteurs sur une échelle de 5 points

Nombre de jours	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4
1	0	0	0	+
2	0	+	0	++
3	0	++++	0	++++
4	0	++++	0	++++

0 : absence d'odeur,

+ : légère odeur caractéristique

++ : odeur assez caractéristique

++++ : odeur très caractéristique

Le ramollissement des feuilles de manioc, apprécié manuellement par le toucher, est obtenu au bout de 4 jours (figure 40) pour les feuilles non stérilisées alors que les feuilles stérilisées restent entières.

Tableau 10 : Appréciation du ramollissement au cours de la fermentation

Temps (jours)	0	1	2	3	4
Feuilles non stérilisées	-	-	-	-	+
Feuilles non stérilisées	-	-	-	-	-

(-) : absence de ramollissement

(+) : ramollissement

3.2 Changement de couleur : brunissement

Le changement de couleur des feuilles de manioc, de vert à vert sombre, est caractérisé par le brunissement (figure 41 et figure 42) résultant de l'oxydation des composés phénoliques grâce à l'action de l'enzyme polyphénol oxydase.

L'extraction de la chlorophylle de feuilles de manioc avant et après fermentation montre un résidu clair pour les feuilles non fermentées et résidu brun pour les feuilles fermentées (figure 41).

Les mesures spectrophotométriques du brunissement (figure 42) montrent une forte augmentation au début de la fermentation avec un pic à 48 heures. Par la suite, ces valeurs décroissent.

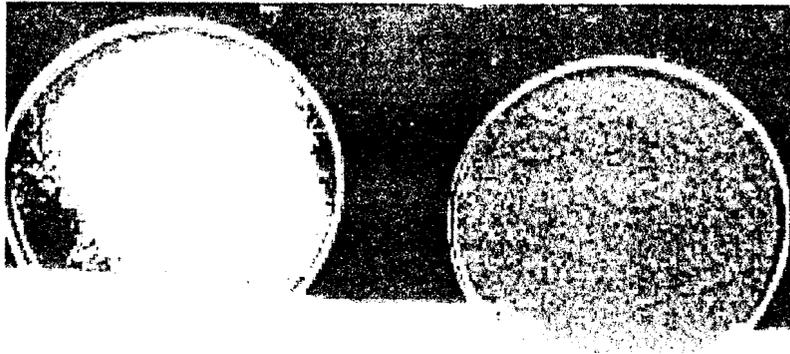
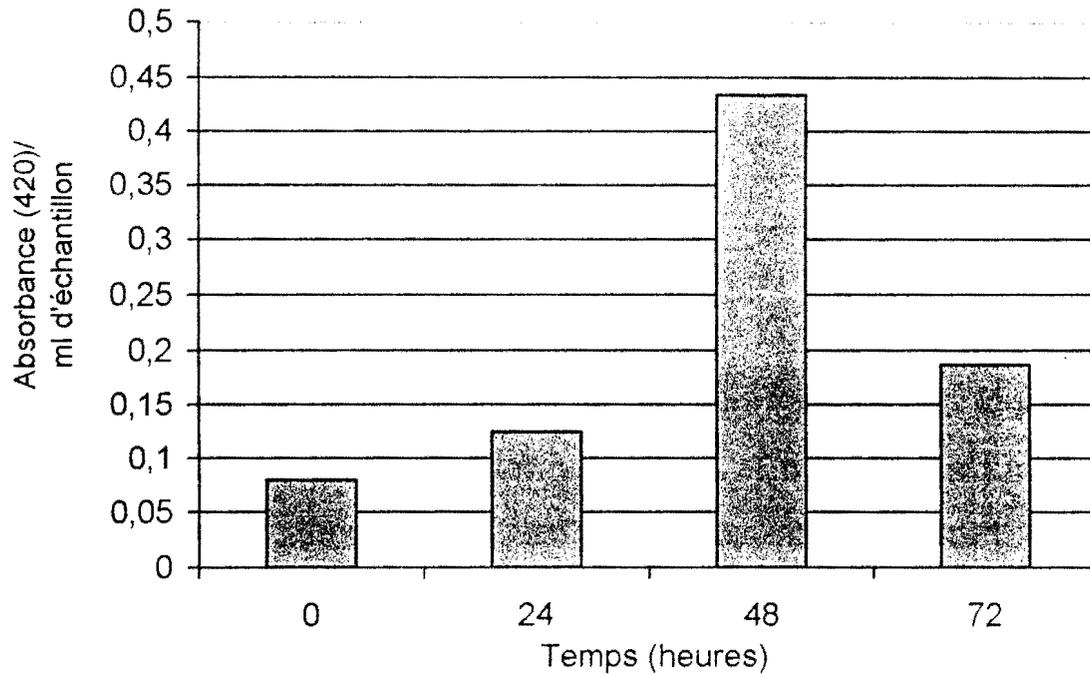


Figure 41 : Brunissement des feuilles fermentées de manioc

Gauche : résidu clair= feuilles non fermentées après extraction de la chlorophylle

Droite : résidu brun= feuilles fermentées après extraction de la chlorophylle

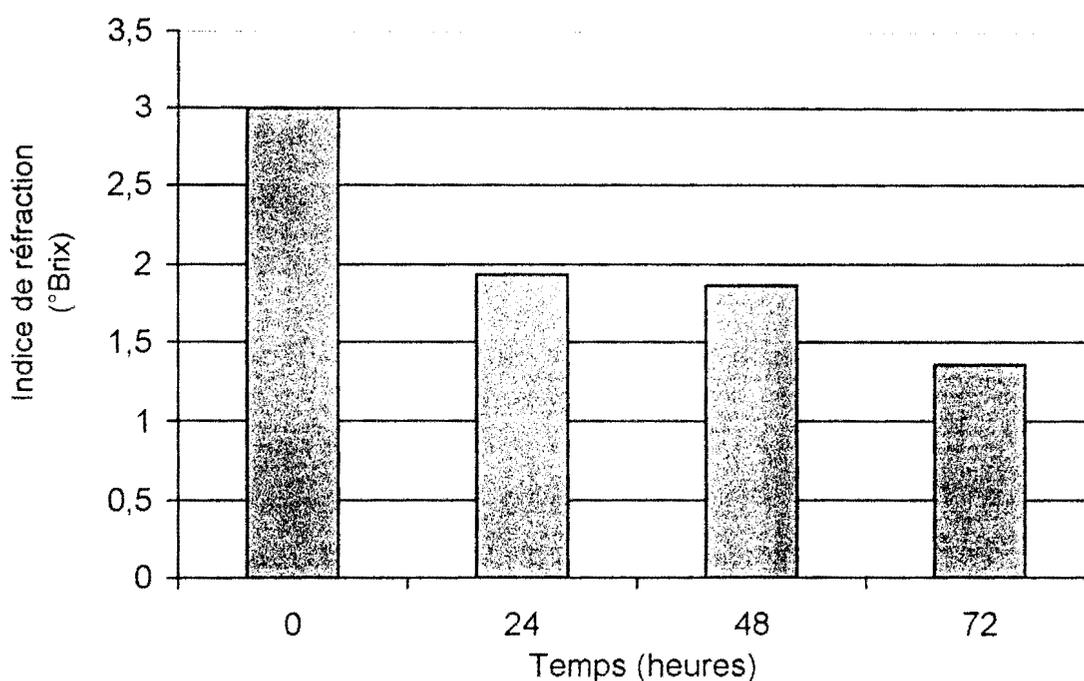
Figure 42 : Brunissement au cours de la fermentation des feuilles de manioc



3.3 Changement d'indice de réfraction

La figure 43 montre la diminution de l'indice de réfraction au cours de la fermentation des feuilles de manioc. Cela correspond, entre autres, à l'évolution des solides solubles dans le milieu de fermentation.

Figure 43 : Evolution de l'indice de réfraction au cours de la fermentation des feuilles de manioc



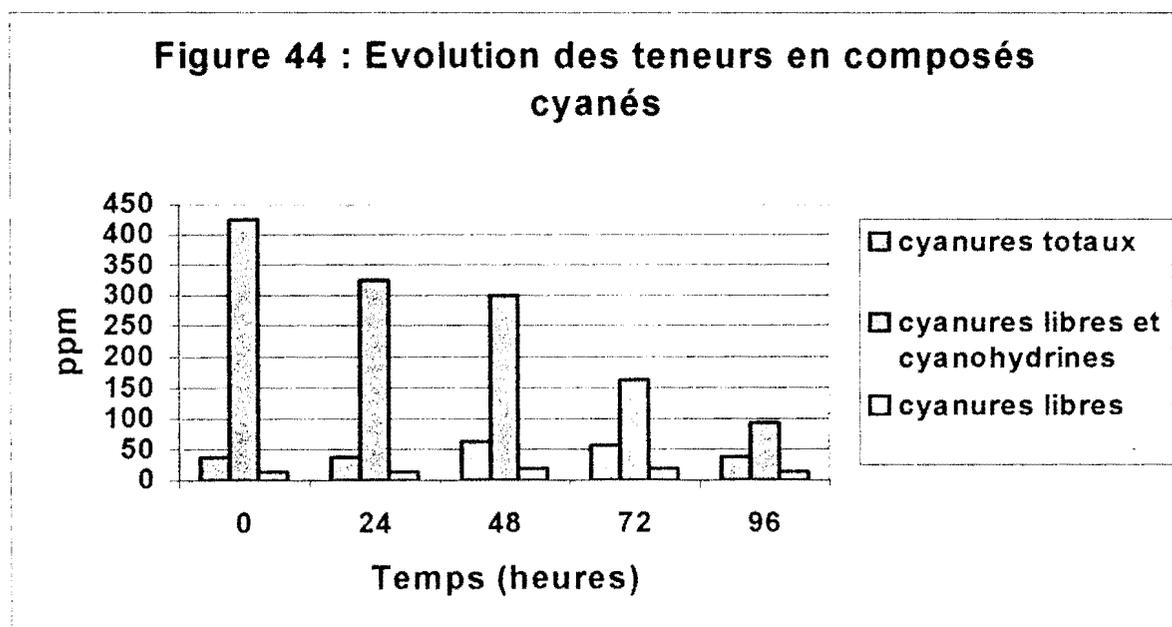
Le ramollissement et le brunissement des tubercules et feuilles de manioc sont deux phénomènes enzymatiques. En effet, les tubercules de manioc stériles incubés en milieu stérile ne subissent pas de ramollissement. Il en est de même pour les feuilles de manioc stériles en milieu stérile, elles restent vertes, sans brunissement ni ramollissement.

4. DETOXICATION DU PRODUIT

4.1. Tubercules de manioc

Evolution des composés cyanés

La teneur totale des composés cyanés dans les tubercules frais est de 414 ppm. La vitesse de dégradation des cyanoglucosides augmente à partir du deuxième jour de rouissage au moment où le phénomène de ramollissement s'accélère. Elle indique une forte activité d'hydrolyse par les enzymes linamarase et hydroxynitrile lyase. Au bout de 4 jours de fermentation, la teneur résiduelle est de 93 ppm, ce qui traduit la dégradation des cyanoglucosides : linamarine et lotaustraline (figure 44)



Le cyanure libre est en quantité infime. Sa concentration ne varie pas de façon significative pendant le processus.

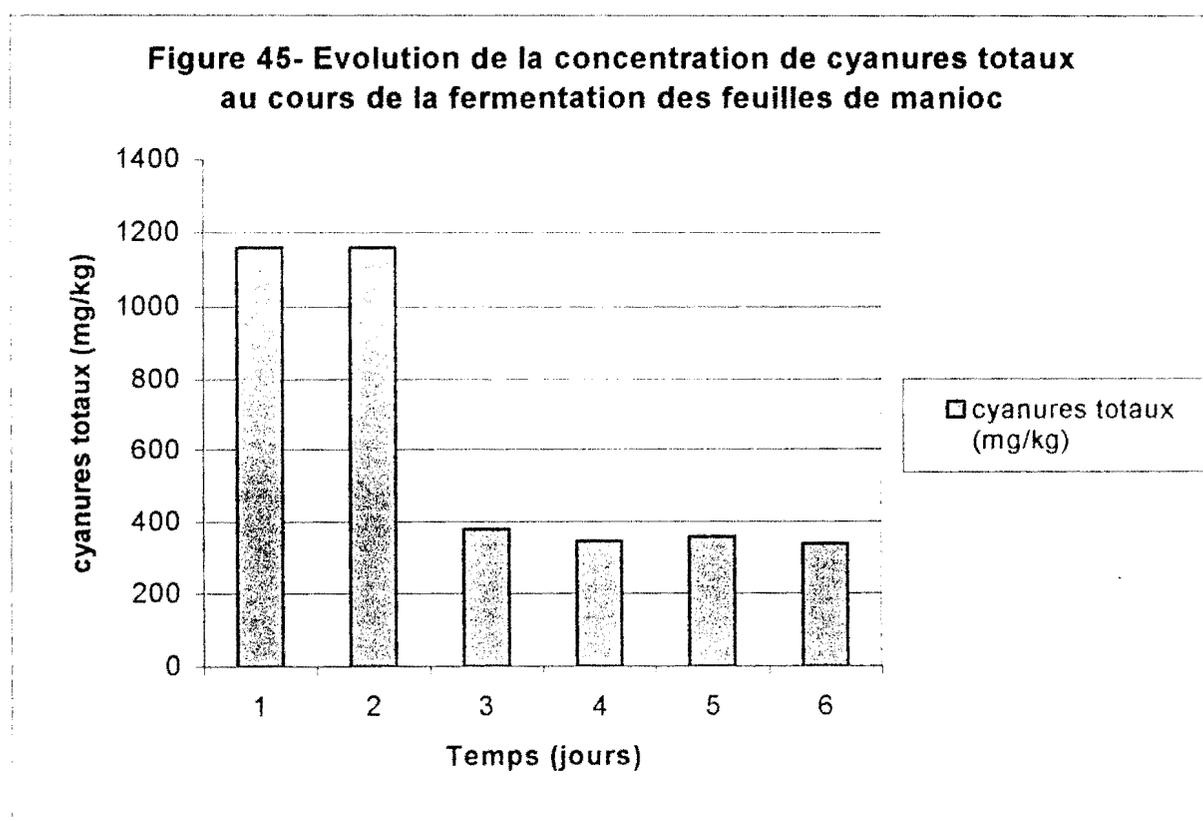
Il y a donc une réduction appréciable des teneurs en composés cyanés à la fin du rouissage.

4.2 Feuilles de manioc

Elimination des composés cyanogéniques

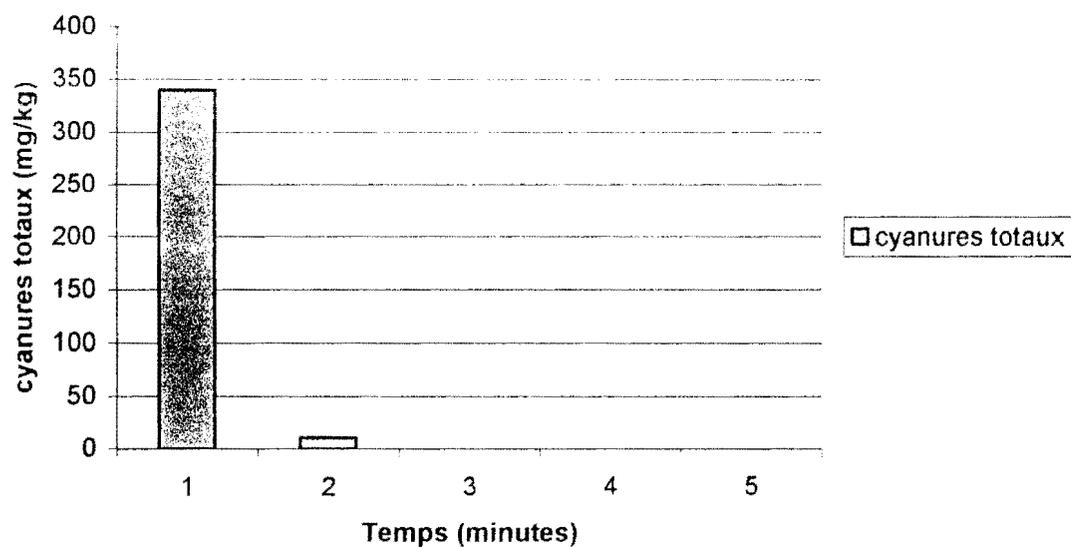
La teneur en acide cyanhydrique diminue fortement après 24 heures de fermentation. Elle passe de 1158 à 339,6 mg/kg soit une baisse de 70,68% (figure 45)

Le taux d'acide cyanhydrique ne varie plus le reste de la fermentation, à cause du pH très alcalin ($\text{pH} > 8$) qui inactive l'enzyme linamarase



Le taux d'acide cyanhydrique devient nul après 2 minutes de cuisson (figure 46) des feuilles fermentées de manioc.

Figure 46- Evolution de la concentration de cyanures totaux au cours de la cuisson



CHAPITRE 4

**DISCUSSION
CONCLUSION GENERALE
BIBLIOGRAPHIE**

1. ASPECTS PHYSICO-CHIMIQUES, BIOCHIMIQUES MICROBIOLOGIQUES

1.1 VIN DE PALME

La sève du palmier à huile évolue en quelques heures pour donner le vin de palme. Le pH acide, environ 4,5, diminue très légèrement, moins d'une demi-unité de variation au cours de la fermentation, alors que l'acidité titrable augmente d'environ 37%. La constance des teneurs en sucres réducteurs constatée pendant les six premières heures ne peut être qu'apparente. En fait, il doit exister un équilibre permanent entre l'utilisation des sucres par les microorganismes et leur production à partir de l'hydrolyse des oligosaccharides tel le saccharose. Après la sixième heure de fermentation, la consommation des sucres l'emporterait sur leur production avec 40% de la teneur en sucres utilisés.

Au cours de la fermentation, la concentration en alcool croît fortement et atteint 0,327%, donnant ainsi au vin de palme son caractère alcoolisé. La fermentation alcoolique paraît être la voie prépondérante de production d'alcool à partir du glucose. En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'effet Pasteur « inhibition de la fermentation par la respiration » est très faible voire inexistante.

Les acides isobutyrique et isovalérique qui sont des métabolites mineurs de fermentation jouent par contre un rôle important dans le développement de la saveur de la boisson.

Il est possible que l'acide lactique produit soit utilisé par *Saccharomyces cerevisiae*. Celui-ci peut l'oxyder en pyruvate grâce à la L-lactate cytochrome c oxydoréductase qui est inductible.

Contrairement aux vins d'appellation, le vin de palme apparaît comme un produit en constante transformation mettant en jeu des fermentations lactique et alcoolique avec les bactéries et les levures.

A propos de cette microflore, la flore microbienne du vin de palme est variée et diffère de celle d'autres vins de palme (28). Elle est à l'origine des transformations enregistrées. En ce qui concerne les levures, Van Pee (25) fait état de plusieurs espèces dont *Saccharomyces cerevisiae*. Dans notre étude, les espèces isolées sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Hanseniaspora guillermondii*. On remarque aussi l'absence, dans le vin de palme congolais, des bactéries lactiques comme les lactobacilles et les leuconostocs et *Acetobacter acetii* isolé du vin de palme nigerian (30). De même, *Zymomonas* souvent considéré comme jouant un rôle important sinon essentiel dans la production de CO₂, d'éthanol, de petites quantités d'acétaldéhyde, et d'acides lactique et acétique est absent du vin de palme congolais (87) (88) (89) (90). L'absence de ces germes du vin de palme congolais est compensée par la présence de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Lactococcus lactis*, espèces absentes dans les autres vins de palme (22) (25) (28) (91) (92). La présence de *Lactococcus lactis*, ayant un faible pouvoir acidifiant par rapport aux lactobacilles expliquerait pour une part les faibles variations de pH observées, tandis que *Saccharomyces cerevisiae* assurerait, par la voie d'Entner – Meyerhof – Parnas, la fermentation alcoolique.

Du point de vue quantitatif, l'examen de l'évolution de la flore bactérienne totale indique, contrairement aux résultats de Okafor (27), une diminution de celle-ci après 24 heures. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que cette microflore soit plus sensible à la présence de l'alcool produit par les levures dont la population augmente avec la teneur en alcool évaluée à 0,327%(p/v). En effet, les levures

Saccharomyces sont plus résistantes à l'éthanol qui est toxique aux bactéries pour des concentrations de 8 à 18 % (p/v).

La microflore du vin de palme diffère donc qualitativement et quantitativement selon les régions.

1.2 PATE FERMENTEE DE MAÏS « POTO- POTO »

La transformation de maïs en *poto- pote* conduit à un environnement acide (pH 3,5). La deuxième caractéristique de ce procédé est l'installation très rapide de conditions anaérobies avec une pression d'oxygène dissous de 2mg/l à la suite de la consommation de l'oxygène dissous dans l'eau par la microflore épiphyte. L'instauration de conditions d'anaérobiose et d'acidité permet de comprendre l'évolution des populations microbiennes. Par ailleurs, ces conditions qui sont plus marquées durant la décantation avec une pression d'oxygène dissous de l'ordre de 1 mg/l et de pH de 3,5 traduisent une activité fermentaire plus intense lors de cette phase. Une meilleure accessibilité du substrat par la microflore favorise ces réactions à la suite du broyage.

Les températures observées au cours du trempage (22°C) et de la décantation (27°C) confirment la différence d'activité microbienne entre les deux phases.

Dans la phase de décantation, il reste du glucose (43%) tandis que le fructose est totalement consommé. La disparition des sucres (maltose, glucose, fructose) est la conséquence de la multiplication des microorganismes comme l'indiquent Daeschel *et al* (93). Les quantités de polyosides intermédiaires maltohexoses et maltoheptoses augmentent mais restent faibles, environ 2% (p/p) ; ce qui traduit une certaine activité amylolytique. Cette dégradation qui ne paraît pas être significative, comme le confirment les résultats de Mbugua (41), reste

cependant suffisante pour la libération des sucres, utilisés par les microorganismes pour leur croissance (94).

Au cours de la fermentation, les acides lactique, acétique et propionique synthétisés contribuent à la formation du goût du produit fermenté, le *poto-poto*. La concentration d'acide lactique augmente très fortement de 0,2 à 6%(p/p), celle de l'acide acétique et de l'éthanol croît très faiblement, 2% en fin de fermentation, l'acide propionique étant à l'état de traces.

La perte importante de matière pourrait être à l'origine de la diminution des éléments nutritifs et explique en partie la pauvreté du *poto-poto* en protéines car les enveloppes ou les téguments riches en protéines ont été retirés (42).

Les bactéries constituent la flore dominante et importante de la fermentation. En effet, leur population croît de 16,6 à 83,34% au cours de la décantation. Des observations similaires ont été également rapportées par Odunfa (95). La différence dans l'évolution des bactéries lactiques au cours des deux phases de la fermentation prouve une différence d'activité dans chaque phase avec la prédominance des acides lactique et acétique pendant la décantation.

La concentration très élevée des bactéries lactiques est en accord avec le pH acide, responsable de l'inhibition du développement de la flore indésirable comme les entérobactéries. Cette microflore, par cet effet, préserve donc l'aliment de la contamination microbienne comme plusieurs auteurs l'ont montré (36)(57)(97)(98). Mbugua *et al* (41) ont également montré que les coliformes, très abondants durant les 24 premières heures de fermentation, disparaissent par la suite. Les

lactobacilles, devenus dominants, produisent suffisamment d'acides organiques qui entravent la multiplication des coliformes.

La réapparition des coliformes au cours de la fermentation est le résultat de recontaminations provenant de mauvaises conditions d'hygiène des ateliers, des instruments de travail et, enfin, des manipulateurs (99).

Contrairement à ce qu'indiquent certains auteurs (96) (60), les levures dont la population est d'environ 7% ne représentent pas, du point de vue quantitatif, une flore prépondérante dans le processus. Mais leur rôle reste important dans la production de l'arôme et du goût du produit (36).

La fermentation de la pâte de maïs (poto-poto) ainsi que celle de la sève du palmier (vin de palme) se déroule en milieu acide (pH 3,5-4,5) dans des conditions d'anaérobiose avec une production d'éthanol et d'acides lactique et acétique et une population microbienne constituée de levures et de bactéries lactiques principalement.

1.3 TUBERCULES ROUIS DE MANIOC

Le rouissage se caractérise d'une manière physico-chimique par une acidification progressive du milieu (pH 4,0 en moins de trois jours) et une instauration très rapide de conditions anaérobies (teneur en oxygène très faible, égale à 0,498 mg/ l en moins de 12 heures. Ces résultats sont en accord avec ceux indiqués dans la littérature (56) (59) (61) (136). Ils sont à mettre en relation avec la présence majoritaire des microorganismes anaérobies et producteurs d'acides organiques (56) (57).

La teneur en cyanoglucosides des racines fraîchement récoltées est de 450 ppm. (Figure 28) Dans la littérature (137) (138) (139), les teneurs varient en fonction des variétés étudiées entre 137 et 1515 ppm. Après

le rouissage traditionnel des tubercules de manioc dans l'eau la teneur en cyanoglucosides est réduite de façon significative (environ 78,5%). Nos résultats confirment ceux obtenus par Agbor-Egbe *et al.* (139) selon lesquels les teneurs en cyanure passent de $401,9 \pm 50,2$ mg à $133,7 \pm 10,4$ mg HCN/kg. La fermentation est ainsi un procédé très efficace dans l'élimination des composés cyanés endogènes des tubercules de manioc.

Comme dans la transformation des grains de maïs, l'acide lactique est le produit majeur de la fermentation avec une concentration de 0,45% (p/p) en fin de fermentation. L'acide acétique, 0,40% (p/p) et l'éthanol, 0,30% (p/p), sont respectivement les deuxième et troisième produits de fermentation. Ils contribuent, à côté d'autres composés volatils, à la flaveur du produit final (128). L'apparition de l'acide butyrique à partir du deuxième jour coïncide avec le début du ramollissement des tubercules de manioc. Sa production peut provenir soit d'une fermentation butyrique clostridienne soit d'une fermentation due aux levures. Cette dernière hypothèse semble la plus probable car les Clostridies se développent mal en milieu acide.

La présence de sucres fermentescibles (saccharose, glucose, fructose) permet, comme l'indiquent Daeschel *et al.* (93), la multiplication des différentes populations microbiennes, en particulier la flore lactique. Les bactéries lactiques constituent la flore dominante du rouissage des tubercules de manioc comme plusieurs chercheurs (56) (123) (124) l'ont également montré. Par la production d'acides organiques comme l'acide lactique, ces bactéries sont responsables de la diminution du pH observée au cours du rouissage. Cette diminution est en accord avec les résultats obtenus par Oyewole *et al.* (127). L'important développement de *Lactococcus lactis* durant les premières

heures de la fermentation est lié à la capacité que possède cette espèce d'hydrolyser l'amidon, principal constituant du manioc. La présence des activités amylolytiques chez ces bactéries conforte cette hypothèse. La prédominance de *Leuc. mesenteroides* (81% de la microflore lactique totale au 2^{ème} jour) est intéressante. Ce germe est producteur de la linamarase (122) qui doit agir très précocement avant que le pH ne diminue. La linamarase, active entre pH 5 et 6, contribue à la dégradation des composés cyanogéniques des tubercules de manioc frais et en assure la détoxification (125) (126).

Au huitième jour du rouissage, *Lb. Plantarum* est l'espèce dominante. Les autres espèces isolées au début du rouissage, *Lb. coprophilus*, *Lb. delbrueckii* et *Leuc. lactis*, disparaissent pratiquement après 48 heures. C'est principalement *Lb. plantarum* qui, en produisant des quantités abondantes d'acide, est responsable de la baisse importante du pH au cours de la fermentation.

Outre cette capacité de production d'acides organiques, les bactéries lactiques du manioc présentent la propriété de résister aux concentrations élevées de cyanure.

Giraud (154) rapporte que la croissance des souches de bactéries lactiques est inhibée par des concentrations proches de 1000 ppm. En revanche, la croissance d'autres bactéries, comme *Escherichia coli*, est totalement inhibée par une concentration de cyanure de 2 à 3 ppm (117).

L'effet inhibiteur du cyanure sur les bactéries lactiques reste donc relativement très faible. Cette propriété est sans doute responsable de la prédominance des bactéries lactiques dans la microflore naturelle de rouissage du manioc. Elle montre que ces micro-organismes sont bien adaptés aux teneurs de cyanure libre présent dans les tubercules de

manioc en rouissage. Vasconcelos *et al.* (135) ont observé que la dégradation des composés cyanogéniques, lors de la fermentation du manioc, conduit à l'accumulation de quantités de cyanure libre pouvant atteindre des teneurs de 200 ppm dans le milieu de fermentation.

Leuconostoc mesenteroides (13,3%) et *Streptococcus lactis* (6,7%) participent au processus de détoxification au cours de la première étape pour trois raisons. Ces bactéries font partie, comme nous l'avons montré, de la microflore lactique majoritaire des deux premiers jours du rouissage (122). Elles sont résistantes à des concentrations très élevées de cyanures, plus de 500 ppm de CN^- (tableau 6). Une proportion élevée de ces bactéries, 86% de *Leuconostoc mesenteroides* et 57% de *Lactococcus lactis*, comme l'indiquent les résultats obtenus, présente une activité β -glucosidasique.

Les bactéries amylolytiques sont quantitativement abondantes (78,43%) mais elles n'hydrolysent que très peu l'amidon comme l'indiquent les très faibles quantités de maltose et maltotriose. L'amylolyse apparaît être un phénomène très limité au cours du rouissage.

La présence des bactéries pectinolytiques généralement douées d'activités pectinestérasique et galacturonasique est à corréliser avec le phénomène de ramollissement des tubercules, une des étapes importantes du rouissage (62). En effet, nos résultats corroborent ceux d'autres auteurs, le ramollissement correspond à un accroissement de l'activité de la pectinestérase et de la polygalacturonase (111) (112) (113).

Les levures, souvent associées aux bactéries lactiques (127) (95) (129) (130), ont un métabolisme important en anaérobiose et à pH acide et leur apparition coïncide avec l'apparition de l'acide butyrique. Elles jouent donc un rôle indéniable dans les caractéristiques organoleptiques du produit final (131).

Les moisissures ne se développent que les trois premiers jours et disparaissent. La diminution du pH à 4 et de la pression d'oxygène dissous à 0,166 mg/ l, au cours du rouissage, constitue des conditions défavorables à leur développement (95).

La séquence de succession des microorganismes observée dans notre étude a été également rapportée par d'autres auteurs (56) (123). Différents facteurs, comme la chute appréciable du pH (126) due à la production d'acides organiques dont les acides lactique et acétique, doivent favoriser le développement de certaines bactéries et en inhiber d'autres. Par ailleurs, les conditions d'anaérobiose permettent le développement des microorganismes micro-aérophiles dépourvus de chaîne respiratoire comme les bactéries lactiques qui constituent la flore majoritaire (122).

1.4 FEUILLES DE MANIOC

Le vin de palme, le poto-poto et les tubercules de manioc rous sont des produits de transformation en milieu acide. Par contre, la production du *ntoba mbodi* s'accompagne d'une alcalinisation importante (pH 8,6) du milieu de fermentation. Cette caractéristique se retrouve dans d'autres produits fermentés comme le ugba (pH 8,7), l'ogiri (pH 7,9), le natto (pH 8,4) et le soumbala (pH 9,0). L'alcalinisation du pH est un facteur important dans la compétition microbienne : elle détermine la séquence de la flore microbienne. L'activité des enzymes pectine et pectate lyases augmente dès la 24^{ème} heure et devient maximale à la 60^{ème} heure bien avant le ramollissement qui est effectif le 3^{ème} jour. Cela suggère une destruction progressive de la paroi cellulaire qui devient maximale au moment de l'apparition du ramollissement.

Les profils de courbe des enzymes pectinolytiques sont identiques. L'équivalence des deux actions dans la pectine lyase pourrait indiquer que les deux activités résident dans le même complexe comme chez *Clostridium multifementans* et agiraient en coordination sur la pectine (114). En effet, la pectine (polyméthyl polygalacturonate), substrat de la pectine lyase, est dégradée en deux étapes d'abord par l'action de l'estérase qui désertérifie la pectine en polygalacturonate puis par celle de la lyase qui scinde le polygalacturonate en unités acide digalacturonique. Pour le pectate (polygalacturonate), substrat de la pectate lyase, seule la lyase agirait.

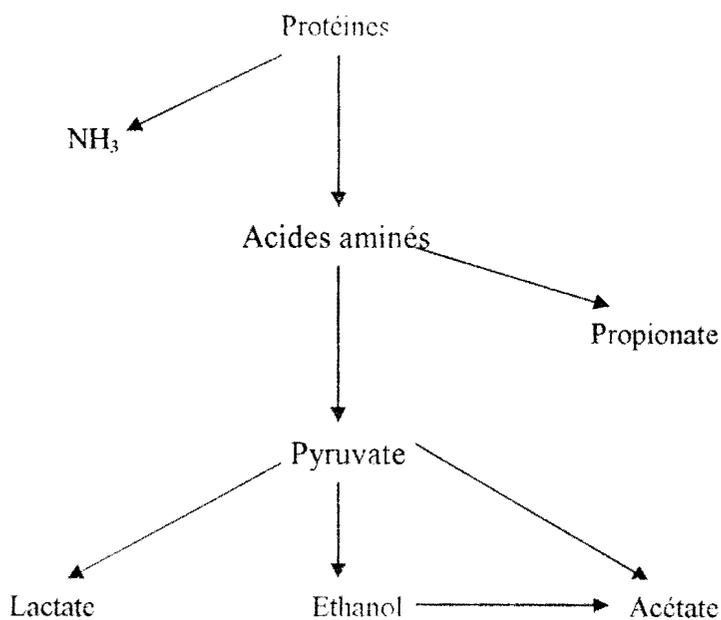
Les feuilles de manioc stérilisées restent entières et vertes au cours de la fermentation. Par contre, le brunissement des feuilles fermentées de manioc avec une forte augmentation d'absorbance à 420 nm (environ 80%) résulte de l'accroissement de plus de 86% de la concentration de polymères polyphénoliques par l'oxydation enzymatique avec les polyphénols-oxydases. Celles-ci, à la suite de la rupture de l'intégrité cellulaire par l'action des enzymes pectinolytiques, entrent en contact avec leur substrat. Ce phénomène de brunissement est intéressant pour le *ntoba mbodi* car il améliore ses propriétés sensorielles (77) (78).

L'alcalinisation du milieu de fermentation (pH 8,5) serait causée par l'action des enzymes microbiennes comme les protéases, les désaminases et les décarboxylases qui engendrent les amines.

Les *Bacillus*, notamment *Bacillus subtilis*, sont, par leur activité protéolytique, à l'origine de l'augmentation de pH en produisant de l'ammoniac par la désamination des acides aminés libérés lors de la dégradation des protéines et peptides (101). Cet environnement est

favorable à l'activité des protéases à sérine des *Bacillus* dont le pH optimum est situé entre pH 8 et 9.

La forte concentration d'acides lactique (8 g/l) et acétique (2,71 g/l) en milieu alcalin, malgré la faible quantité de bactéries lactiques (environ 4%), proviendrait d'une part de l'activité de certains *Bacillus* (115) et d'autre part de la dégradation anaérobie des protéines, peptides et acides aminés par les microorganismes.



Catabolisme anaérobie des protéines, peptides et acides aminés

En comparaison aux techniques classiques de blanchiment et de cuisson à la vapeur ou au séchage au soleil qui permet d'éliminer 82 à 94% de composés cyanogéniques (47), la fermentation des feuilles de manioc peut ainsi être considérée comme un procédé efficace avec 70,68% d'élimination de ces composés.

En effet, le pH alcalin tout en favorisant le développement des *Bacillus* qui deviennent la microflore dominante de la fermentation assure l'hydrolyse des cyanohydrines en acétone et acide cyanhydrique. L'acide cyanhydrique peut se solubiliser ou se volatiliser. En plus de la tolérance

aux fortes concentrations d'acide cyanhydrique produit, certaines souches de *Bacillus*, notamment *Bacillus pumilus*, ont la capacité d'utiliser l'acide cyanhydrique pour leur nutrition (116) (117) et contribueraient ainsi à la réduction de la teneur en acide cyanhydrique dans le milieu de fermentation.

Du point de vue des microorganismes, le processus de transformation des feuilles de manioc est lié à l'évolution de micro-organismes naturels des feuilles fraîches, comme dans le cas d'autres produits fermentés d'origine végétale (100) (101).

Cette microflore, abondante et particulièrement variée, comprend des micro-organismes couramment rencontrés dans les produits végétaux fermentés (100) (103) mais aussi des espèces inhabituelles telles *Micrococcus varians*, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus sciuri* et *Staphylococcus xylosus* (104).

En revanche, les souches de *Leuconostoc*, particulièrement *Leuconostoc mesenteroides*, reconnues essentielles au cours de la phase initiale de la fermentation des composés d'origine végétale (105) (106) et les levures considérées importantes dans la fermentation des sucres résiduels sont absentes sans nul doute à cause du pH très élevé du produit. En effet, dans la fermentation des feuilles de manioc, la microflore non lactique supplante, après deux jours de fermentation, la microflore lactique qui diminue quantitativement

La cinétique d'évolution de cette microflore du *ntoba mbodi* diffère de celle des fermentations d'autres composés d'origine végétale.

Effectivement avec des pH optima de croissance de 5,5 à 6,2 pour les lactobacilles, de 5,5 à 6,5 pour les pédiocoques et de 6,3 à 6,5 pour les lactocoques et leuconostocs (107) (108) (109) (110), l'aptitude des bactéries lactiques à poursuivre la croissance ne peut être que

compromise par le pH du milieu dont les valeurs maximales sont comprises entre 8 et 9. De ce fait, les bactéries lactiques ne paraissent pas essentielles mais, peuvent contribuer, à travers leurs métabolites, en partie aux qualités organoleptiques et nutritionnelles du produit fini.

Les microorganismes susceptibles de jouer par contre un rôle significatif dans cette transformation seraient essentiellement *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosum* et *Erwinia spp.* Ces microorganismes sont producteurs d'un fort arsenal d'enzymes polysaccharolytiques dont les pH optima d'activité, compris entre 8 et 8,50 (111), se situent dans l'intervalle des pH du milieu de fermentation des feuilles de manioc. Ces enzymes, en dégradant les pectines et les polysaccharides des tissus, favorisent le ramollissement observé des feuilles de manioc (112) (113) et améliorent ainsi la digestibilité de la matière organique végétale.

La transformation des feuilles de manioc en *ntoba mbodi*, comme la production d'autres produits fermentés dans lesquels une fermentation alcalinisante est mise en œuvre (101) (118) ne dure que 4 jours alors que la fermentation est beaucoup plus longue pour d'autres produits fermentés d'origine végétal : 14 jours environ pour les soja, betteraves, concombres, tomates, 30 jours environ pour les carottes (119), 60 à 90 voire 120 jours pour la choucroute ou le kimchi coréen (120). Au delà de 4 jours, il se produit une altération significative du *ntoba mbodi*, contrairement à ce qui est observé dans les aliments fermentés d'origine végétale qui subissent une fermentation lactique acidifiante (121).

2. ASPECTS FONDAMENTAUX DES TRAVAUX

La fermentation de ces quatre aliments révèle :

- la diversité des composés produits et de types de fermentation
- une microflore adaptée à l'environnement
- et les changements de texture et de couleur

Elle se déroule dans les conditions d'anaérobiose (pression d'oxygène dissous 0,1mg/l) et de pH acide (pH 3,5-4,5) sauf pour les feuilles de manioc où le pH est alcalin (pH 8,5-9,0). Les principaux métabolites produits au cours de ces diverses fermentations sont le lactate, l'acétate et l'éthanol. Cependant, le type de fermentation varie en fonction de la nature du matériel végétal et des microorganismes présents, principalement les bactéries lactiques, *Bacillus* inclus, d'autres bactéries et les levures. Dans les quatre aliments fermentés, les bactéries lactiques ont été isolées. Elles sont souvent en compétition avec les levures sauf pour les feuilles fermentées de manioc où la compétition se fait avec les *Bacillus*.

2.1 Diversité de composés produits et types de fermentation

Comme dans toutes les fermentations, la production des quatre aliments étudiés s'accompagne de la synthèse d'une diversité de produits qui restent néanmoins très caractéristiques. Il faut noter:

- (a) des composés acides notamment les acides lactique et acétique au cours du rouissage des tubercules de manioc, de la fermentation des feuilles de manioc et des grains de maïs ;
- (b) les composés alcooliques notamment l'éthanol dans le vin de palme ;
- (c) les composés aminés, principalement l'ammoniac dans la fermentation des feuilles de manioc ;
- (d) les composés aromatiques, comme les acides isovalérique et

propionique contribuant à l'arôme et à la flaveur de chacun des aliments fermentés.

Tous ces composés produits permettent de classer et de retrouver les trois catégories de fermentations alimentaires : la fermentation alcoolique avec le vin de palme, la fermentation acide lactique dans le cas des tubercules rous de manioc et de *poto-poto* et la fermentation alcaline dans les feuilles fermentées de manioc, *ntoba mbodi*.

2.2 Microflore caractéristique adaptée à l'environnement

La sève du palmier à huile, le grain de maïs, le tubercule et la feuille de manioc constituent chacun un environnement ou une niche écologique où existe une microflore épiphyte typique. Au cours de la fermentation, une compétition s'établit et une microflore s'installe selon une séquence caractéristique en fonction des conditions de l'environnement. Celles-ci constituent donc un facteur de sélection.

a) Le premier de ces facteurs est le pH. Lorsque le pH baisse et devient acide (pH 4), les bactéries lactiques et les levures dans le rouissage des tubercules de manioc et la fermentation de la pâte de maïs prospèrent bien. La grande majorité des bactéries lactiques sont acidophiles, cependant certaines espèces sont alcalophiles, notamment dans le *ntoba mbodi*. C'est le cas des *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus macerans*, etc ...).

Même à pH acide, la quantité de composés produits au cours de la fermentation influence le comportement de certains groupes microbiens et entraîne une séquence caractéristique de la microflore. Ainsi les

Lactococcus lactis dominant après 24 heures de fermentation sont remplacés par *Leuconostoc mesenteroides*, lui-même supplanté en fin de rouissage par *Lactobacillus plantarum*.

De même, une séquence de la microflore s'établit lorsque le pH augmente et devient basique (pH 8,5) dans la fermentation des feuilles de manioc « *ntoba mbodi* », les bactéries lactiques arrêtent leur croissance et le développement des *Bacillus* et *Staphylococcus* est favorisé. Certaines espèces de *Bacillus* (*Bacillus pumilus*) sont capables d'utiliser l'acide cyanhydrique, une substance toxique libérée au cours de la fermentation des tubercules et feuilles de manioc.

b) Au pH se superpose un autre facteur de sélection, la variation de la pression d'oxygène dissous. Ainsi, les bactéries aérobies dominant au début de la fermentation dans un environnement de pression d'oxygène élevée sont rapidement remplacées par les bactéries aéro- anaérobies, micro- aérobies et anaérobies comme *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacillus* et *Clostridium* quand la pression d'oxygène devient très faible au cours de la fermentation des grains de maïs, des tubercules et feuilles de manioc.

c) Le substrat lui-même, c'est-à-dire le matériel végétal, par sa composition contribue à la compétition microbienne.

Microflore du vin de palme	Microflore de la pâte de maïs « poto-poto »
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Hanseniopsis guilliermondii</i>	<i>Lactococcus lactis sp lactis</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Staphylococcus spp</i>	Levures
<i>Streptococcus spp</i>	Moisissures
Microflore des tubercules de manioc	Microflore des feuilles de manioc
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Acinetobacter calco aceticus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Enterobacter spp</i>	<i>Bacillus circulans</i>
<i>Lactobacillus coprophilus</i>	<i>Bacillus macerans</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Bacillus spp</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Erwinia spp</i>
<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Klebsiella spp</i>	<i>Lactobacillus spp</i>
Levures	<i>Lactobacillus lactis diacetylactis</i>
Moisissures	<i>Micrococcus varians</i>
	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
	<i>Staphylococcus sciuri</i>
	<i>Staphylococcus xylosus</i>

En plus de ces facteurs physico-chimiques, certains métabolites de fermentation peuvent jouer le rôle d'antagonistes.

Ainsi, aux fortes teneurs d'alcool dans le vin de palme, la croissance des levures est favorisée tandis que celle des bactéries sensibles à l'alcool est inhibée. En présence d'acide cyanhydrique, certaines bactéries lactiques présentent une grande résistance à des concentrations élevées d'acide cyanhydrique (plus de 800 ppm) alors que d'autres sont inhibées dans le cas du rouissage de manioc. Par ailleurs, dans la fermentation des feuilles de manioc, l'acide cyanhydrique joue le même rôle de substrat plutôt que d'antagoniste pour certains *Bacillus* comme *Bacillus pumilus*.

(a) Les levures (notamment *Saccharomyces cerevisiae*) et les bactéries hétérolactiques prédominent et conduisent à la production d'alcool à partir de la sève du palmier pour donner le vin de palme. (b) Les bactéries lactiques (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*) constituent la flore dominante dans la production de la pâte fermentée de maïs et les tubercules rous de manioc, à côté de levures, microflore complémentaire, responsable des arômes. (c) Les bactéries du genre *Bacillus* prédominent dans la transformation des feuilles de manioc à côté d'autres bactéries lactiques et conduisent à un produit basique, le *ntoba mbodi*.

2.3 Changement de texture et de couleur

Les transformations fermentaires s'accompagnent de changements physico-chimiques, notamment le changement de texture et de couleur.

a) ramollissement

Le changement de texture est marqué par le ramollissement des tubercules et feuilles de manioc initié et accompli sous l'action des enzymes pectinolytiques, pectine et pectate lyases, d'origine microbienne et végétale.

Le maximum des activités pectinolytiques au cours de la fermentation des feuilles de manioc (figure 26) est atteint à la 60^{ème} heure alors que l'état de ramollissement intervient à la 96^{ème} heure. De même, dans le rouissage des tubercules de manioc, le dénombrement de la microflore pectinolytique est maximale à la 72^{ème} heure (figure 4) tandis que le ramollissement survient à la 96^{ème} heure.

Il apparaît que le processus de fermentation des tubercules et feuilles de manioc implique une rupture progressive des parois de la cellule, qui est maximale à l'apparition du ramollissement. Dans le cas des tubercules de manioc, le ramollissement est initié de l'extérieur vers l'intérieur. Les enzymes pectate et pectine lyases sont donc très importantes dans le ramollissement des feuilles et tubercules de manioc lié à la fermentation (143) (60). Cela est en accord avec les principaux rôles assignés à la pectine méthylestérase et la polygalacturonase dans les interactions hôte/ pathogènes. Ces enzymes entraînent la macération du tissu, des pertes d'électrolytes et même la mort de la cellule (143). Par ailleurs, les enzymes protéolytiques participent également au ramollissement.

b) brunissement

Le changement de couleur des feuilles fermentées de manioc est caractérisé par le brunissement résultant de la polymérisation des polyphénols par la polyphénol-oxydase libérée lors du ramollissement.

2.4 Détoxification du produit

a) hydrolyse des glucosides cyanogéniques

Il est généralement admis que la fermentation est responsable de la détoxification du produit fermenté. Ainsi, dans les tubercules et feuilles de manioc les linamarases et hydroxynitriles lyases végétales et microbiennes contribuent, par leur action concertée, à l'hydrolyse des glucosides cyanogéniques, notamment la linamarine et lotaustraline (62) (135), aussi bien en fermentation lactique des tubercules de manioc qu'en fermentation alcaline des feuilles de manioc.

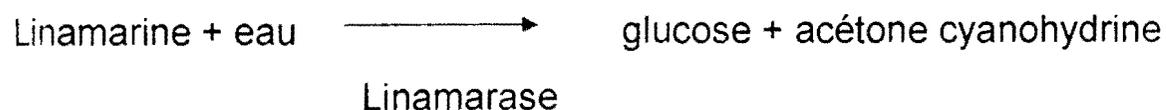
Cette action concertée qui se déroule tant en milieu acide que basique fait appel à un mécanisme de catalyse générale acide ou basique ou encore concertée.

b) détermination du mécanisme d'élimination de l'acide cyanhydrique à partir des produits de fermentation

La compréhension des mécanismes par lesquels le cyanure est libéré au cours de la transformation est importante. Une approche à la détermination de ces mécanismes est de considérer les types de produits de manioc, les tubercules rous et les feuilles fermentées.

La dégradation de la linamarine a lieu en deux étapes.

La linamarine est hydrolysée en glucose et acétone cyanohydrine par l'enzyme linamarase (44) (70)



L'acétone cyanohydrine se dissocie, soit spontanément aux pH $\geq 5,0$, soit sous l'action de l'enzyme hydroxynitrile lyase pour donner l'acétone et l'acide cyanhydrique (58) (68) (140)



De façon significative, le cyanure produit est déplacé par solubilisation ou volatilisation (47) (63) (67). En effet, l'acide cyanhydrique dont la température d'ébullition est de 25,7°C se volatilise rapidement.

L'étude de la stabilité de l'acétone cyanohydrine à différents pH (61) (135) (140) (141) a montré que ce composé est très instable aux pH alcalins et se dissocierait spontanément sans l'intervention d'une deuxième enzyme (63).

Certaines études sur la fermentation du manioc ont attribué la détoxification des tubercules de manioc à l'hydrolyse spontanée de la linamarine et de la lotaustraline par les acides organiques produits et la baisse du pH qui en résulte. D'autres études (142), au contraire, ont démontré la stabilité inhabituelle de la linamarine en milieu acide dilué même à 100°C ; ce qui rendrait invraisemblable la détoxification par l'hydrolyse chimique sous l'action des acides faibles formés pendant la fermentation.

Notre étude sur les fermentations de tubercules et de feuilles de manioc a montré la baisse du pH de 7,2 à 3,8 dans le cas des tubercules et l'augmentation du pH de 6,8 à 8,5 dans celui des feuilles, parallèlement à la détoxification et au ramollissement dans les deux cas. Ce sont les activités conjuguées de la linamarase endogène des tissus et de la linamarase microbienne (52) (142) (144) (145) qui contribuent à

l'hydrolyse des glucosides cyanogéniques et à la réduction de plus de 70% de la teneur en cyanure des produits du manioc.

La linamarase est active sur une plage de pH 4,0 à pH 8,0, avec une activité optimale à pH 6,0, mais inactive à pH 3,0 et à pH 9,0. Au dessous de pH 3,5 et au dessus de pH 8,0 il y a plus de 50 % de perte d'activité (140) (146). L'acidification à pH 4,0 dans le rouissage des tubercules de manioc et l'alcalinisation à pH 8,5 dans la fermentation des feuilles de manioc s'effectuent dans un intervalle de pH correspondant à la zone d'activité de la linamarase. Cela peut expliquer l'hydrolyse de la linamarine dans les deux cas. L'hydrolyse de la linamarine peut donc avoir lieu par catalyse générale soit acide soit basique à l'instar de l'hydrolyse des esters.

De plus, l'hydroxynitrile lyase du manioc *Manihot esculenta* Crantz qui hydrolyse en deuxième étape l'acétone cyanohydrine est une enzyme à sérine. Elle contient au niveau du site actif la triade catalytique ser, asp, his. (153).

Les deux étapes de l'hydrolyse de la linamarine par la linamarase et l'hydroxynitrile lyase peuvent donc s'effectuer aussi bien en fermentation acide qu'en fermentation alcaline.

Ainsi, l'approche pour déterminer le mécanisme de détoxification par l'hydrolyse de la linamarine à partir de produits de fermentation conduit à suggérer l'intervention d'une catalyse générale acide ou basique ou encore concertée. Elle met en relief la relation entre la croissance microbienne, l'activité enzymatique et le ramollissement du matériel végétal.

2.5 Relations entre ramollissement, croissance microbienne et détoxification

Le ramollissement des tubercules et des feuilles de manioc est la caractéristique principale indiquant la fin de la fermentation. Il est causé par la sécrétion par les microorganismes des enzymes dégradant les parois cellulaires (143). Celles-ci permettent le contact entre la linamarase endogène et la linamarine après destruction des compartiments de la linamarase et de la linamarine (56) (143).

Les dynamiques de la réduction du cyanure durant la fermentation des feuilles et tubercules de manioc, de la microflore associée et des activités pectinolytiques ainsi que l'évolution du ramollissement ont donc été étudiées

Grâce aux enzymes pectinolytiques microbiennes, la rupture de la paroi des cellules végétales libère des éléments nutritifs qui diffusent et deviennent accessibles aux microorganismes pour leur développement.

L'étude de certains microorganismes a montré l'aptitude de ceux-ci à synthétiser l'enzyme linamarase en présence du substrat approprié linamarine ou lotaustraline. Parmi ceux-ci se trouvent *Lactococcus lactis* (57%), *Leuconostoc mesenteroides* (86%) et *Lactobacillus plantarum* (40%). La présence de *Leuconostoc mesenteroides* a été rapportée également dans la pâte de manioc en fermentation (160).

La linamarase de *Leuconostoc mesenteroides* est inductible et présente l'activité sur une plage de pH 4,0- 8,0 avec un optimum à pH 6,0 – 9,5 - (140) (146) (147) (148) (149) (150) (151) (152). Au-dessus de pH 8,0, il y a perte rapide d'activité. Une inactivation rapide survient au-dessous de pH 3,5 et au-dessus de pH 8,0 avec une perte d'activité de 50 %.

La diminution de pH de 7,2 à 3,8 dans le cas de la fermentation des tubercules est occasionnée par les acides organiques, notamment les acides lactique et acétique, produits au cours de la fermentation. (figure 25). Le niveau élevé de pH (pH 8,5 - 9,0) dans la fermentation des feuilles de manioc est causé par l'action des enzymes microbiennes comme les protéases, les désaminases et les décarboxylases qui engendrent les amines. Il accentue ainsi le clivage des cyanohydrines en acide cyanhydrique volatil.

L'alcalinisation du pH faciliterait la réduction de la teneur en cyanogènes, ce qui est tout à fait différent du niveau bas de pH (pH 3,8 à 4,2) dans le rouissage des tubercules (figure 20) (58) (63) (68) (140). La fermentation des tubercules et feuilles de manioc se déroulant à température ambiante (plus de 26°C), une partie de l'acide cyanhydrique se solubilise.

En conclusion, les fermentations alimentaires montrent donc la diversité des produits synthétisés et des populations microbiennes en action que nous avons caractérisés. Elles mettent en jeu des interactions complexes entre différents groupes microbiens et entre molécules diverses entraînant la détoxification, la modification de texture et la formation d'arômes et de saveurs caractéristiques de chaque aliment fermenté.

CONCLUSION GENERALE

Les résultats des aliments fermentés traditionnels étudiés montrent que :

- ◆ les activités métaboliques des bactéries lactiques ou des *Bacillus*, seules ou en association avec d'autres bactéries, des levures ou des moisissures, apportent des changements majeurs dans la couleur, l'arôme, la flaveur et la texture des aliments fermentés traditionnels.

Dans la plupart des cas, le développement des qualités sensorielles désirées des aliments fermentés traditionnels dépend d'une contribution composite de deux ou plusieurs types de microorganismes.

- ◆ la fermentation permet la préservation et la valorisation des aliments.
- ◆ la fermentation peut aussi servir de processus de détoxification et d'amélioration de la valeur nutritionnelle en protéines, lipides et vitamines.
- ◆ la fermentation peut améliorer la digestibilité des aliments avec la production d'enzymes digestives.

La compréhension des conditions physico-chimiques et de l'écologie microbienne de ces aliments fermentés traditionnels permettra de :

- ◆ Optimiser le processus de fermentation

- ◆ Réaliser les fermentations contrôlées en mono et polycultures.
- ◆ Mettre au point des starters adéquats pour le développement des fermentations naturelles.
- ◆ caractériser les arômes de chaque aliment et les souches productrices desdits arômes.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D., - La cellule. 1995. Flammarion. Paris
- (2) (169) METZLER, D.E.- Biochemistry. 1977. Academic Press. New York
- (3) (171) LIM, D.-Microbiology. 1998, McGraw-Hill
- (4) BRYANT, M.P.- Microbial methane production-theoretical aspects. Journal of Animal Science, 1979, 48,1
- (5) van BELLEGEM, - Methane production from the effluent of the potato starch industry. Biotechnology Letters, 1980, vol. 2 No 5, pp. 219-224
- (6) Ethane generation from human, animal and agricultural wastes. 1977. National Academy of Sciences. Washington, D.C.
- (7) ODUNFA, S.A. - Microbiology and amino acid composition of ogiri, a food condiment from fermented melon seeds. Die Nahrung, 1981, 25, 811-816
- (8) ODUNFA, S.A.-African fermented foods. In "Microbiology of fermented foods ", 1985, vol. 2, ed. Wood B.J.B. London and New York: Elsevier Press.
- (9) OGBADU, L. and OKAGBUE, R.N. - Bacterial fermentation of soya bean for dawadawa production. Journal of Applied Bacteriology, 1988, 65, 353-356
- (10) Microbial processes: Promising Technologies for Developing Countries. 1979. National Academy of Sciences. Washington, D.C.
- (11) ROSE, A.- La production des aliments et des boissons. Pour la Science. 1981. pp 120-130.

- (12) BOURDET, A.- La biochimie du pain. La Recherche, 1977 (Janvier), No 74, vol.8, 37-46
- (13) DIXON, B. - Invisible allies. 1976? Ed Temple Smith – London
- (14) DIRAR, H.A. - The indigenous fermented foods of the Sudan.1993. Cab International
- (15) FLICKINGER, M.C. and TSAO, G.T. - Fermentation substrates from cellulosic materials: Fermentation products from cellulosic materials. Annual Reports on Fermentation Processes. 1978. vol. 2, 23-41
- (16) MARX, J.L. - A revolution in biotechnology. 1989 –ICSU Press by Cambridge University Press. Cambridge.
- (17) CHIBATA, I., TOSA, T. and SATO, T. - Immobilised biocatalysts to produce amino acids and other organic compounds. In Enzymes and Immobilised cells in Biotechnology, ed. A.I. Laskin, 1985, pp. 37-70. Benjamin / Cummings Publishing Co., Menlo Park, California.
- (18) LITCHFIELD, J.H. - Single cell protein. Science, 1983, 219, pp. 740-746
- (19) DEMAİN, A. L. - The astonishing synthetic versatility of microorganisms. Biotechnology Letters, 1980, vol. 2 No 4, pp. 171-176
- (20) EVELEIGH, D.E. - The microbial production of industrial chemicals. Scientific American, 1981, 245 (March), pp154-178
- (21) ROSE, A. – Economic Microbiology, 1978, vol.2, Primary Products of Metabolism, Academic Press
- (22) BASSIR O. – Observations on the fermentation of palm-wine. W. Afr. J.Biol. Appl. Chem. 1962, 6 21-25.

- (23) FAPARUSI S.I., BASSIR O – Factors affecting the quality of palm wine. *W. Afr. J. Biol. Appl. Chem.* 1972, 15, 17-28.
- (24) STEINKRAUS K. H. – Handbook of indigenous fermented foods. M. Dekker (N.Y., Basel). 1983, 9, 315-328.
- (25) Van PEE W., SWINGS J.G. – Chemical and microbiological studies on Congolese palm wine (*Elaeis guineensis*). *East Afr. Agric. Food J.*, 1971, 36, 311-314
- (26) FAPARUSI S. I. – Origin of initial microflora of palm wine from oil palm trees (*Elaeis guineensis*). *J. Appl Bact.*, 1973, 36, 559-565
- (27) OKAFOR N.- Preliminary microbiological studies on the preservation of palm wine *J. Appl. Bact.*, 1975, 38, 1-7.
- (28) OKAFOR N. – Microbiology of Nigerian palm wine with particular reference to bacteria *J. Appl. Bact.*, 1975, 38, 81-88.
- (29) OKAFOR N. – Palm wine yeasts from parts of Nigeria. *J. Sci. Food Agric.*, 1972, 23, 1399- 1407.
- (30) OKAFOR N. – The sources of the microorganism in palm wine. *Nigerian Soc. for Microbiol. Proc.*, 1972, 1, 102- 106.
- (31) PANDI A. – La place et le rôle du palmier dans la civilisation de l'ancien royaume Kongo du 15 au 19^{ème} siècle. Mémoire de D.E.S Université Marien Ngouabi, Brazzaville, 1984.
- (32) BAYENDA, J.P.- Contribution à l'étude microbiologique du vin de palme (*Elaeis guineensis* Jacq). 1985 (octobre). Mémoire de fin d'études. Université Marien NGOUABI. Brazzaville, Congo.
- (33) MALONGA, M., MAVOUNGOU, O., KOBAWILA S.C., LOUEMBE, D.- Etude microbiologique et biochimique du vin de palme (*Elaeis guineensis* Jacq) en République Populaire du Congo. *Microbiologie –Aliments – Nutrition*, 1995, vol. 13 : 195-200.
- (34) STEINKRAUS K.H., CULLEN R. E., PERDERSON C.S., NELLIS L.F., GAVITT B.K. – Handbook of Indigenous Fermented Foods.

Microbiology series. 1983. Vol. 9: Marcel Dekker Inc. (N.Y. and Basel)

- (35) AKINGBALA J.O., ROONEY L. W., FAUBION J. M. – A laboratory procedure for preparation of ogi, a Nigerian fermented food. *J. Food Sci.*, 1981, 46, 1523- 1526.
- (36) AKINRELE I.A. – Fermentation studies on maize during the preparation of a traditional African starchcake food. *J. Sci. Agric.*, 1970, 21, 619-625
- (37) ANDAH A., MULLER H.G. – Studies on koko, a Ghanaian fermented maize porridge. *Ghana J. Agric. Sci.*, 1973, 6, 93- 102.
- (38) SCHWEIGART F., de WIT J. P. – Favourite beverage of the bantu. Preparing and drying the mahewu and its nutritional value. *Food Indust. S. africa*, 1960,12, 25-27
- (39) TRECHE S., GIAMARCHI P., GALLON G., MASSAMBA J. – Les bouillies de sevrage au Congo : composition, valeur nutritionnelle et modalités d'utilisation. 5^{ème} journées internationales du Germ, Montpellier, 22-27 novembre 1992.
- (40) AKINRELE I.A., EDWARDS C.C.A. – An assessment of the nutritive value of a maize-soya mixture, Soya-Ogi, as a weaning food in Nigeria. *Brit.J. Nutr.*, 1971, 26, 177-185.
- (41) MBUGUA S.K. – Microbial and biochemical aspects of Uji (an East African sour cereal porridge) fermentation, and its enhancement through application of lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis. Cornell University, 1981.
- (42) BOUVIER M. – Etude du mode de fonctionnement des ateliers de fabrication de "poto-poto" à Brazzaville. Mémoire de DESS, Université de Montpellier II, 1992.
- (43) BRANDTZAEG B., MALESHI N.G., SAVANBERG U., DESIKACHAR H.S.R., MELLANDER O. – Dietary bulk as a

limiting factor for nutrient intake in preschool children. III – Studies of malted flour from gari, sorgum and green gram. *J. Trop. Pediatrics*, 1981, 27, 184-189.

- (44) NARTEY F. *Manihot esculenta* in Africa: Utilization as human food and animals feed. Munksgaard, Copenhagen, 1978, 42-43
- (45) EGGUM, B.O. The protein quality of cassava leaves. *British Journal of Nutrition*, 1970, 24, 761-768
- (46) RAVINDRAN, G. & RAVINDRAN, V. Changes in the nutritional composition of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves during maturity. *Food Chemistry*, 1988, 27, 299-309
- (47) GOMEZ G., VALDIVIESO M. –Cassava foliage: chemical composition, cyanide content and effect of drying on cyanide elimination. *J. Sci. Food Agric.*, 1985, 36, 433-441.*
- (48) ROGERS D. J., MILNER M. – Amino acid profile of manioc leaf protein in relation to nutritive value. *Econ. Bot.* 1963, 17, 211-216.
- (49) ROSS E., ENRIQUEZ F. O. – The nutritive value of cassava leaf meal. *Poult. Sci.* 1969, 48, 846-853.
- (50) MONTGOMERY R.D. – Cyanogens in I.E. LIENER (ed), *Toxic constituents of plant foodstuffs*. Academic Press (New York), 1980, 143-160.
- (51) DUNSTAN W. R., HENRY T. A., AULD S. J.M. –Cyanogenesis in plant. The occurrence of phaseolunatin in cassava (*Manihot aipi* and *Manihot utilissima*). *Proc. Roy. Soc. London*, 1996, 78, 152-158.
- (52) BUTLER G. W., KENNEDY L.D. –Studies on the glucosidase “linamarase”. *Phytochemistry*, 1965, 4, 369-381.
- (53) DUNICAN L.K. – Strategies for developing the cassava industry. Nuclear and related techniques in the improvement of traditional

- fermentation processing of cassava. International Atomic Energy Agency (Vienna, Austria), 1990, 9-14.
- (54) LANCASTER P.A., INGRAM J.S., LIM M.Y., COURSEY D.G. – Traditional cassava-based products: Survey of processing techniques. *Econ. Bot.* 1982, 36, 12-45.
- (55) ONGUSUA O., OKAFOR N., ONYEKWERE O.O., AKINRELE I.A. –Nigerian gari, in K.H.STEINKRAUS (ed.), *Handbook of Indigenous Fermented Foods*, Vol. 9, Marcel Dekker (Balsen, New York), 1983, 208-220.
- (56) OKAFOR N., IJIOMA B., OYOLU C. – Studies on microbiology of cassava retting for foo-foo production. *J. Appl. Bactériol.*, 1984, 56, 1-13.
- (57) MERAZ M., SHIRAL K., LARRALDE P., REVAH S. – Studies on the bacterial acidification process of cassava (*Manihot esculenta*). *J. Sc. Food Agric.*, 1992, 60, 457-463.
- (58) CONN E.E. - Cyanogenic glycosides. *J. Agric. Food Chem.*, 1969, 17, 519-526.
- (59) OYEWOLE O.B., ODUNFA S.A. –Characterisation and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. *J. Appl. Bacteriol.*, 1990, 68, 145-152.
- (60) AMPE F., KELEKE S., ROBERT H., BRAUMAN A. The role of pectin degrading enzymes during cassava retting, in T. AGBOR-EGBE, A. BRAUMAN, D. GRIFFON, S. TRECHE (reds.), *Transformation alimentaire du manioc*, Editions ORSTOM 1995, 331-344.
- (61) MADUAGWU E.N. – Differential effects on the cyanogenic glycoside content of fermenting cassava root pulp by β -glucosidase and microbial activities. *Toxicology Lett.* 1983, 15, 335-339.

- (62) OKAFOR N., EJIOFOR M.A.N. – The microbial breakdown of linamarin in fermenting pulp of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *MIRCEN J.*, 1986, 2, 327-338.
- (63) COOKE R.D. – An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Sc. Food Agric.*, 1978, 29, 345-352.
- (64) HOWLETT W.P., BRUBAKER G.R., MLINGI N.L.V., ROSLING H. – An epidemic upper motor neuron disease studied in Tanzania. *Brain*, 1990, 113, 223-235.
- (65) MLINGI N.L.V., ASSEY V.D., POULTER N.H. ROSLING H. – Cyanohydrins from insufficiently processed cassava induces konzo, a newly identified paralytic disease in man, in A. WESTBY, P.J.A. REILLY (eds.), *Proc. Regional Workshop on Traditional African Foods – Quality and Nutrition*. Foundation for Science, 25-29 November 1991, 163-169.
- (66) BALAGOPALAN, C., PADMAJA G., NANDA, S., MORTHY, S., *Cassava in Food, Feed and Industry*. 1988, CRC Press, Boca Raton, FL.
- (67) IKEDIOBI, C., ONYIA G., ELUWAH, C., A rapid inexpensive enzymatic assay for total cyanide in cassava and cassava products. *Agric. Biol. Chem.* 1980, 44, 2803-2809.
- (68) NARTLEY, F., *Studies on cassava, Cyanogenesis : the biosynthesis of linamarin and lotaustralin in etiolated seedlings*. *Phytochemistry*, 1968, 7, 1307-1312.
- (69) TEWE, O., Cyanogenic glycoside, protein interaction in cassava peel based rations. *Nutr. Rep. Int.*, 1984, 30, 425-431.
- (70) UMOH, I., ONGUNKOYA, F., OKE, O., Effect of thiamin status on the metabolism of linamarin in rats. *Ann. Nutr. Metal.*, 1985, 29, 312-324.

- (71) OKE, O., Toxicity of cyanogenic glycosides. *Food Chem.*, 1980, 6, 97-109.
- (72) REXOVA – BENKOVA, L., MARKOVIC, O., *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.*, 1976, 33, 323-385.
- (73) THIBAUT, J.F., *Biochimie appliquée*, Gauthier –Villars, Paris, 1980, 323-385.
- (74) JAUNEAU, A., Thèse de 3è cycle, Rouen, 1985.
- (75) HODGE, J.E. and OSMAN, E.M.- Carbohydrates. In "Principles of Food Science, Part1 Food Chemistry." (Ed.) O. Fennema, 1976, p. 41. Marcel Dekker, New York
- (76) TROLLER, J.A. and CHRISTIAN, J.H.B.-Enzyme reactions and non enzymatic browning. In "Water Activity and Food ". Academic Press, New York, 1978, p.48
- (77) MARTINEZ M. VICTORIA, WHITAKER John R. - The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 1995, 6,195-200
- (78) WHITAKER, J.R. - Polyphenol oxidase. In *Food Enzyme: Structure and Mechanism*; Wong, D. W. S.,Ed. ; Chapman and Hall : New York, 1995, pp.271-307
- (79) BOURGEOIS C.M., LARPENT J.P. – Les fermentations alimentaires. *Techniques et documentations*. Lavoisier (Paris), 1990.
- (80) COLLINS C.H., LYNE P.M. – *Microbiological Methods* (4th edn.), Butterworths (London). 1979.
- (81) HARRIGAN W.F., McCANCE M.E. – *Laboratory methods in food and dietary microbiology*. Academic Press (London). 1976.
- (82) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn, R.E. BUCHANAN and N.E. GIBBONS (eds.), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.

- (83) BARNETT J.A., PAYNE W., YARROW D. –Yeasts: characteristics and identification, Cambridge University Press, 1983.
- (84) LODDER, J. - the yeasts, a taxonomic study, North Holland Publ. Co. (Amsterdam), 1970.
- (85) SEREME, A., KOUDA-BONAFOS, M. And NACRO, M. - Phenolic compounds in Sorghum caudatum tissues during plant development. Biomass and Bioenergy, 1993, vol. 4, No 1, pp 69-71
- (86) WOOD, B.J.B., HOLZAPFEL, W.H.- The genera of lactic acid bacteria. 1995, vol.2.
- (87) DADDS M.J.S., MARTIN P.A., GARR J.G. – The doubt status of the species *Zymomonas anaerobia* and *Zymomonas mobilis*. J. Appl. Bact., 1973, 36, 531- 539.
- (88) DAWES E.A., RIBBONS D.W., LARGE J.P. – The route of ethanol formation *Zymomonas mobilis* Biochem. J., 1966, 98, 795.
- (89) SWINGS J., DE LEY J. The biology of *Zymomonas*. Bact. Rev., 1977, 5. 1-46
- (90) DE LEY J., SWINGS J. – Phenotypic description numerical analyses and proposal for an improved taxonomy and nomenclature of the genus *Zymomonas* kluyver and Van Niel. Intern. J. System. Bacteriol., 1976, 4, 146- 157.
- (91) OKAFOR N. – Microbiology and biochemistry of oil palm wine. Appl. Microbiol., 1978, 24, 237- 257.
- (92) NYAKO K.O – Palm wine, an alcoholic beverage of Ghana. Symposium of indigenous fermented foods (Bangkok, Thailand), 1977.
- (93) DAESCHEL M.A., FLEMING H.P., McFEETERS R. F. - Mixed culture fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeasts. J. Food Sci., 1988, 53, 862-864

- (94) OTENG-GYANG K.O., ANUONYE C.C. – Biochemical studies of the fermentation of cassava (*Manihot utilissima* Pohl). *Acta Biotechno.*, 1987, 3, 280-292.
- (95) ODUNFA S.A., ADEYELE S. – Microbiological changes during the traditional production of Ogi-baba, a West- African fermented sorghum gruel. *J. Cereal Sci.*, 1985, 3, 175-180.
- (96) OKAFOR I.N., OYOLU C. – Study on cassava retting for foo-foo production. *J. Appl. Bacteriol.*, 1984, 56, 1-13
- (97) MENSAH P.A., TOMKINS A.M., DRASER B.S., HARRISSON T.J. – Effect of fermentation of Ghanaian maize dough on the survival and proliferation of 4 strains of *Shigella flexneri*. *Trans. Royal Soc. for Trop. Medecin and Hygiene*, 1988, 82, 635-636.
- (98) ADAMS M.R., HALL C.J. – Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Intern. J. Food Sci. Technol.*, 1988, 23, 287- 292.
- (99) ROWLAND M.G.M., BARRELL R.A.E., WHITEHEAD R.G. – Bacterial contamination in traditional Gambian weaning foods. *Lancet*, 1978, 1, 136-138.
- (100) ETCHELLS J.L., FLEMING H.P., BELL T.A. – Factors influencing the growth of lactic acid bacteria during brine fermentation of cucumbers. In *lactic acids bacteria in beverages and food* (Eds Carr J.G., Cutting C.V. and Whiting G.C.), 1975, 281-305. Academic Press, New York.
- (101) STEINKRAUS. K.H. – African alkaline fermented foods and their relation to similar food in other parts of world. In *traditional African foods – Quality and Nutrition*. 19, 87-91.
- (102) PEDERSON C. S. – Sauerkraut. In "Advances in food research", Eds Chichester C.O., MRAK E. M. and STEWART G. F. 1960, 10, 233-291. Academic Press, New York.

- (103) FLEMING H. P. – Fermented Vegetables. In Economic microbiology. Fermented foods (Ed. Rose A. H.), 1982, 227-258. New York, Academic Press.
- (104) PEDERSON C. S. and ALBURY M. N. – Control of fermentation. In K.H. STEINKRAUS (ed.), Handbook of Indigenous fermented foods, Marcel DEKKER, New York, 1983, 102-108
- (105) MUKHERJEE S. K., CHAUDHURI D. R. And GANGOPADHYAY H. – Studies on sauerkraut as a fermented food of india. In K.H. STEINKRAUS (ed.), Handbook of Indigenous fermented foods, Marcel DEKKER, New York, 1983, 109-114.
- (106) GARVIE E.I. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, Eds P.H.A. Sneath et al. ; Williams et Wilkins, Baltimore. 1986, 1071-1075.
- (107) HARDIE J.M. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, Eds P.H.A. Sneath et al. ; Williams et Wilkins, Baltimore. 1986, 1068.
- (108) KANDLER O. et WEISS N. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, Eds P.H.A. Sneath et al. ; Williams et Wilkins, Baltimore. 1986, 1209.
- (109) MUNDT J.O. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol, Eds P.H.A. Sneath et al. ; Williams et Wilkins, Baltimore. 1986, 1063-1065.
- (110) THIBAUT J.F. – Etude structurale des substances pectines à l'aide d'une endopolygalacturonase d'Aspergillus : Purification, propriétés et possibilités d'utilisation de cette enzyme. Thèse Doctorat d'Etat, Université de Nantes (France), 1983.
- (111) PETER H. A. S. – Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In PETER H. A. S., NICHOLAS S. M., SHARPE Elisabeth

- M., (eds) Bergey's manual of systematic Bacteriology, volume 2, Williams et Wilkins, Baltimore. 1986, 1104-1207.
- (112) SCHLEIFER K. H. – Gram-positive cocci. In PETER H. A. S., NICHOLAS S. M., SHARPE Elisabeth M., (eds) Bergey's manual of systematic Bacteriology, vol. 2. Williams et Wilkins, Baltimore. 1986, 999-1103.
- (113) SHEIMAN M.I., MACMILLAN I., MILLER I, CHASE Jr. T.- Coordinated action of pectinesterase and polygalacturonate lyase complex of *Clostridium multifementans*. J. Biochem. 1976. 64. 565- 572
- (114) COMBERT- BLANC, Y. Caractérisation et étude physiologique d'une nouvelle bactérie lactique thermophile, *Bacillus thermoamylovorans*, isolée du vin de palme. Thèse de Doctorat ès sciences. Université de Provence, Aix- Marseille I, 1995.
- (115) SKOWRONSKI, B., STROBEL, G.A. - Can. J. Microbiol. 1969, 15, 93 –95
- (116) KNOWLES C.J. – Microorganisms and cyanide. Bacteriol. Rev., 1976, 40, 652-680.
- (117) WONG P. P.W. and JACKSON H. – Chinese hum choy. In Handbook of Indigenous fermented food, K.H. STEINKRAUS (ed.), Marcel DEKKER, New York, 1983, 118-119.
- (118) FLEMING H. P., McFEETERS R.F., THOMPSON R.L. – Test for susceptibility of fermented vegetables to secondary fermentation. J. Food Sci., 1983, 48, 982-983.
- (119) MHEEN T., LEE K., CHANG C., LEE S. – Korean kimchi and related vegetable fermentations. In Handbook of Indigenous fermented foods, K.H. STEINKRAUS (ed.), Marcel DEKKER, New York, 1983, 114-118.

- (120) BEAL C., DESCHAMPS N., JUILLARD V., H. de ROISSART, RICHARD J., SARAUX B. – Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. In Bactéries lactiques tome I. H. de ROISSART et LUQUET F.M. (Coordonnateurs.), Loriga (éd), Uriage-France. 1994, 367-401.
- (121) MALONGA M., MAVOUNGOU O., KOBAWILA S-C., LOUEMBE D., BRAUMAN A. – Les bactéries lactiques au cours du rouissage : caractérisation et évolution. Microbiol. – Alim – Nutr., 1993, 11, 471-475.
- (122) NGABA P.R., LEE J.S. – Fermentation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), J. Food Sc., 1979, 44.
- (123) REGEZ P.F., SCHMIDT-LORENZ W. – Identification des bactéries isolées de la pâte de manioc et d'un pain de manioc (chikwangue) au Zaïre. Lebensmittel Technol., 1988, 21 (4), 66-69.
- (124) LARPENT J.P., LARPENT-GOURGAUD M.- Eléments de microbiologie, vol. I, Hermann (Paris), 1985.
- (125) OKAFOR N. et al. – Microorganisms associated with cassava fermentation for gari production. J. Appl. Bacteriol., 1977, 24, 279-289.
- (126) OYEWOLE O.B., ODUNFA S.A. – Microbiological studies on cassava fermentation for "lafun" production. Food microbiol., 1988, 5, 125-133.
- (127) ABE M.O., LINDSAY R.C. – Evidence for a lactic streptococcal role in Nigerian acidic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) fermentation. J. Food Protection, 1977, 41, 781-784.
- (128) WOOD B.J.B. – Lactobacillus-yeast interactions ; their contribution to fermented foodstuffs, especially traditional bread,

- in Mixed Culture Fermentation. Academic Press, London, 1981, 137-150.
- (129) VENKATASUBBAIAH P., DWARKANATH C.T., MURTY V.S. – Involvement of yeast flora in “idli” batter fermentation. *J. Food Sci. Technol.*, 1985, 22, 88-90.
- (130) STEINKRAUS K.H., VAN VEEN A.G., THEIBEAU D.B. – Studies on “idli” – an Indian fermented black grain rice food. *Food Technol.*, 1967, 21, 916-919.
- (131) HOBSON G.E. – Pectinesterase in normal and abnormal tomatoes. *Biochem. J.*, 1963, 86, 358.
- (132) HOBSON G.E. – Polygalacturonase in normal and abnormal tomatoes. *Biochem. J.*, 1964, 92, 324.
- (133) GRIERSON D., – TUCKER G.A. R. – The molecular biology of ripening, in J. FRIEND (ed.), *Recent Advances in Biochemistry of Fruit and Vegetables*. Academic Press, London, 1981.
- (134) VASCONCELOS A.T., TWIDDY D.R., WESTBY A., REILLY P.J.A. – Detoxification of cassava during gari preparation. *Int. J. Food Sci., Technol.*, 1990, 25, 198-203.
- (135) EKSITTIKUL T, CHULAVATNATOL M. – Characterization of cyanogenic β - glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Archiv. Biochem.*, 1988, 266, 263- 269
- (136) GOMEZ G., VALDIVIESO M., CUESTA DE LA D., KAWANO K. – Cyanide content in whole-root chips of ten cassava cultivars and its reduction by oven drying or sun drying on trays. *J. Food Technol.*, 1984, 19, 97-102.
- (137) O'BRIEN G.M., MBOME L., TAYLOR A.J., POULTIER N.H. – Variation in cyanogen content of cassava during village processing in Cameroon. *Food Chem.*, 1992, 44, 131-136.

- (138) AGBOR-EGBE T., MBOME I.L., TRECHE S. – The effectiveness of cyanogen reduction during cassava processing into miondo, in T. AGBOR-EGBE, D. GRIFFON, S. TRECHE (reds.), Transformation alimentaire du manioc, Editions ORSTOM, 1995, 307-318.
- (139) COOKE R.D., BLAKE G.G., BATTERSHILL J.M. – Purification of cassava linamarase. *Phytochemistry*, 1978, 17, 381-383.
- (140) FORMUNYAM R.T., ADEGBOLA A.A., OKE O.I. – Technical note : the stability of cyanidrine. *Food Chem.*, 1985, 17, 221-225.
- (141) WOOD T. – The isolation, properties and enzymic breakdown of linamarin from cassava. *J. Sc. Food Agr.*, 1966, 17, 85-90.
- (142) OKOLIE P.N., UGOCHUKWU E.N. – Changes in activities of cell wall degrading enzymes during fermentation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with *Citrobacter freundii*. *J. Sc. Food Agric.*, 1988, 44, 51-61.
- (143) BALA NAMBISAN, SUNDARESAN S. – Effect of processing on the cyanoglucoside content of cassava. *J. Sc. Food Agric.*, 1985, 36, 1197-1203.
- (144) IKEBIODI C.O., ONYIKE E., CHRISTOPHER O.I., ELEWECHI O. – Linamarase activity and detoxification of cassava (*Manihot esculenta*) during fermentation for gari production. *Agric. Biol. Chem.*, 1982, 46, 1667-1669.
- (145) OKAFOR N., EJIOFOR M.A.N. – The linamarase of *Leuconostoc mesenteroides* : production, isolation and some properties. *J. Sc.*, 1985, 36, 669-678.
- (146) IKEBEDIO C.O., OGUNDU E.C., UKOHA A.I. – Linamarase from *Fusarium equiseti*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1987, 25, 327-333.

- (147) ITOH-NASHIDA T., HIRAIWA M., UDA Y. – Purification and properties of β -D-glucosidase (linamarase) from butter bean, *Phaseolus lunatus*. *J. Biochem.*, 1987, 101, 847-854.
- (148) YEOH H.H., SIA H.L. – Characterization of cassava leaf β -glucosidase. *J. Singapore Nat. Acad. Sc.*, 1987, 16, 17-20.
- (149) LEGRAS J.L., KAAKEH M.R., ARNAUD A., GALZY P. – Purification and properties of β -D-glucosidase from a nitrile hydratase-producing *Brevibacterium* sp. strain R312. *J. Basic Microbiol.*, 1989, 29, 655-669.
- (150) YEOH H.H. – Kinetic properties of β -glucosidase from cassava. *Phytochemistry*, 1989, 28, 721-724.
- (151) ISTOCK U., LIEBEREI R., HARM S.H – Pattern of enzymes involved in cyanogenesis and HCN metabolism in cell cultures of *Phaseolus lunatus* L. varieties. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1990, 22, 105-112.
- (152) WAJANT, H., FORSTER, S., BOTTINGER, H., EFFENBERGER, F., PFINZENMAIER, K. – Acetone cyanohydrin lyase *Manihot esculenta* (cassava) is serologically distinct from other hydroxynitrile lyases. *Plant Science*, 1995, 108, 1- 11
- (153) GIRAUD E. – Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté. Thèse de Biologie Cellulaire, Microbiologie, Université de Provence, Aix-Marseille I, 1993.

ANNEXE

PUBLICATION N°1

ETUDE PRELIMINAIRE DE LA MICROBIOLOGIE DU VIN DE PALME
ELAEIS GUINEENSIS

D. LOUEMBE (*), S.C. KOBAWILA (*), J.P. BAYENDA (*), V. MANLA (*),
Odile MICHAUX (**), Monique LARPENT (**), M. MALONGA (**).

PALM WINE : MICROBIOLOGICAL STUDY
IN POPULAR REPUBLIC OF CONGO

Summary

The types and numbers of organisms encountered vary widely even from tree to tree. 28 samples collected from *Elaeis guineensis* have been studied (urban region and country department). 210 cultures isolated have been identified: 44 *B. subtilis*, 13 *B. sphaericus*, 13 *B. pumilus*, 29 *Streptococcus diacetylactis*, 52 *Streptococcus spp.*, 41 *Corynebacterium spp.*, 3 *Staphylococcus spp.*, 1 *Pseudomonas fluorescens*, 13 *Saccharomyces cerevisiae* and 1 *Hanseniaspora guillermondii*. *B. sphaericus* and *B. pumilus* are only presents in urban region, *Hanseniaspora* and *Pseudomonas* are inhabitants of the palm wine of country department. Numerous lactic *Streptococcus* but not *Lactobacillus* have been isolated. *Zymomonas* has not been discovered.

KEY WORDS : Palm wine - Congo - *Bacillus* - *Streptococcus* - *Saccharomyces* - *Hanseniaspora*

Ce travail porte sur une étude préliminaire du vin de palme congolais pour lequel il n'existe aucune information (1,4). 28 échantillons proviennent des palmiers à huile *Elaeis guineensis* dont 26 d'arbres développés en région urbaine (Brazzaville) et 2 de plantes présentes dans un département rural. 210 souches microbiennes ont été identifiées. Pour le genre *Bacillus*, ont été rencontrés: 44 *B. subtilis*, 13 *B. sphaericus*, 13 *B. pumilus*. 29 *Streptococcus diacetylactis* ont été identifiés ainsi que 52 autres *Streptococcus spp.*, 41 *Corynebacterium spp.*, 3 *Staphylococcus spp.*, 1 *Pseudomonas fluorescens*. Pour les levures *Saccharomyces cerevisiae* a été isolé 13 fois et une seule souche d'*Hanseniaspora guillermondii* a été identifiée. Les mêmes bactéries se retrouvent dans les échantillons d'origine rurale et urbaine à l'exception de *B. sphaericus*, *B. pumilus* présents uniquement dans le vin récolté en ville. *Hanseniaspora*, *Pseudomonas fluorescens* n'existent que dans la boisson d'origine rurale. L'importance des Streptocoques lactiques et l'absence de Lactobacilles sont à souligner (5). L'absence de *Zymomonas* pose le problème du rôle de ces bactéries par rapport aux levures dans la fermentation alcoolique de ce produit (1, 2, 3).

(*) Département de Biologie cellulaire et moléculaire, Faculté des Sciences, B.P. 69, Brazzaville (Congo).

(**) Laboratoire de Microbiologie Université de Clermont II, 4, rue Ledru, 63038 Clermont-Ferrand Cedex.

BIBLIOGRAPHIE

- FAPARUSSI S.L. - Origin of initial microflora of palm wine from oil palm trees (*Elaeis guineensis*), J. Appl. Bact., 1973, 36, 559-565.
- OKAFOR N. - Microbiology and biochemistry of oil palm wine. Advances in applied microbiology, 1978, 24, 237-257.
- OKAFOR N. - Microbiology of Nigeria palm wine with particular reference to bacteria. J. Appl. Bact., 1975, 38, 81-88
- VAN PEE W. and SWING J.G. - Chemical and microbiological studies on congolese palm wine (*Elaeis guineensis*). East Afr. Agr. For., 1971, 36, 311-314.
- STEINKRAUS K.H. - Handbook of indigenous fermented foods, M. Dekker, N.Y., Basel, 1983.

PUBLICATION N°2

ETUDE MICROBIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DU VIN DE PALME (*ELAEIS GUINEENSIS* JACQ) EN REPUBLIQUE DU CONGO

A. MALONGA (*), O. MAVOUNGOU (*), S.C. KOBAWILA (*), D. LOUEMBE (**)

PALM WINE: MICROBIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDY
IN REPUBLIC OF CONGO

Summary

The types and numbers of organisms encountered vary widely even from three to tree. 30 samples collected from *Elaeis guineensis* have been studied (urban area and country area). 210 cultures isolated have been identified: 44 *Bacillus subtilis*, 13 *B. sphaericus*, 13 *B. pumilus*, 29 *Lactococcus lactis*, 52 *Streptococcus* spp., 41 *Corynebacterium* spp., 3 *Staphylococcus* spp., 1 *Pseudomonas fluorescens*, 13 *Saccharomyces cerevisiae* and 1 *Hanseniaspora guilliermondii*.

B. sphaericus and *B. pumilus* are only presents in urban region. *Hanseniaspora* and *Pseudomonas* are recovered in the palm wine of country area. Numerous *Lactococcus lactis* never mentioned in literature have been isolated. *Zymomonas*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* which are often cited in literature have not been recovered. The pH varied from palm tree to palm tree, but for a given palm tree, pH changes in time (24 h) were very slight. Sugar levels also varied from tree to tree.

KEY-WORDS: Palm wine - *Lactococcus lactis* - *Saccharomyces cerevisiae* - *Zymomonas* - *Leuconostoc* - *Hanseniaspora guilliermondii* - Isobutyric acid - Isovaleric acid - Acetic acid - Ethanol.

INTRODUCTION

Parmi les boissons locales consommées au Congo, le vin de palme, obtenu par fermentation naturelle de la sève sucrée du palmier, reste une boisson très prisée. C'est un liquide blanchâtre, pétillant, à saveur sucrée et aigrelette, d'un goût assez agréable. Il est peu alcoolisé et contient 1,5 à 2,1% d'éthanol [1]. Son pH varie entre 4 et 5 [2]. La concentration en sucres solubles de la sève du palmier varie entre 12 et 15%, le principal sucre étant le saccharose. On trouve également en faible quantité le glucose, le fructose, le raffinose, le maltose et les oligosaccharides [3]. La sève fermentée contient aussi des acides organiques et des acides aminés [4].

La flore microbienne du vin de palme est très diverse. Elle est constituée de bactéries lactiques, acétiques, de *Zymomonas* spp., de microcoques et de levures [5, 6, 7, 8, 9].

L'importance socio-économique de cette boisson dans notre pays [10] nous a conduits à étudier les caractéristiques microbiologiques de ce vin et à suivre l'évolution du pH, des sucres réducteurs et des métabolites produits au cours de la fermentation.

(*) Laboratoire de biotechnologie, Faculté des Sciences, B.P. 69, Brazzaville (Congo).

Echantillons - Vingt sept échantillons proviennent de trois palmiers à huile (*Elaeis guineensis*) situés sur le terrain de la Faculté des Sciences (zone urbaine). Un prélèvement est réalisé sur chaque palmier trois fois par semaine pendant trois semaines. Trois autres proviennent d'un palmier à huile en zone rurale. Un prélèvement est réalisé une fois par semaine durant également trois semaines. Les échantillons de sève sont récoltés dans des fioles stériles.

Préparation des échantillons pour les analyses microbiologiques - Immédiatement après chaque récolte, une série de dilutions décimales de l'échantillon est effectuée en eau peptonée stérile à 1% exempté d'indole.

Milieux et conditions de culture - Les milieux de cultures (11) utilisés sont les suivants: - Milieu au malt à 2% additionné de rose bengale à 1% pour les levures (culture à 37°C pendant 48 heures) - Plate Count Agar (P.C.A.) pour la microflore mésophile totale (culture à 30°C pendant 48 à 72 heures) - Glucose Yeast Agar (G.Y.A.) pour les *Zyomonas* (culture en double couche à 25°C pendant 48 heures) - Gélose M.R.S. à pH 5,5-6 pour les bactéries lactiques (culture en double couche à 30°C pendant 48-72 heures) - Milieu de Terzaghi (M 17) pour les streptocoques lactiques (culture en double couche à 30°C pendant 48-72 heures). 0,1 ml de chacune des dilutions décimales est ensemencé sur les différents milieux en boîtes de Petri (3 boîtes pour chaque milieu). Après culture, les différentes colonies sont repiquées et conservées sur les milieux ci-après avant d'être identifiées: - Milieu trypticase soja (Bio Mérieux) - Milieu GYA - Milieu M.R.S. (Merck 106 69) - Milieu de Sabouraud (Bio Mérieux) - Milieu M 17 (Merck 15029).

Dénombrement et identification - Le dénombrement de la flore est fait sur douze échantillons (neuf échantillons de la zone urbaine et trois échantillons de la zone rurale). Il porte sur les bactéries totales et sur les levures développées après 24 heures, respectivement sur le milieu P.C.A. et sur le milieu au malt à 2% additionné de rose bengale. L'identification des souches isolées, à partir de tous les échantillons, est faite selon les méthodes usuelles (observation microscopique; coloration de Gram; recherche de la catalase, de l'oxydase, des spores, du type de métabolisme respiratoire) et en utilisant le matériel API SYSTEM (API 50 CH; API 20 E; API Strept; API Staph; API 20 NE).

Préparation des échantillons pour les analyses biochimiques - Après leur récolte, les échantillons sont incubés pendant 24 heures à la température ambiante de 25°C. Au cours de l'incubation, on réalise, toutes les 3 heures, un prélèvement de 10 ml de vin de palme à partir duquel on mesure le pH. Après mesure du pH, l'échantillon est centrifugé à 8000 tours / mn. Le surnageant ainsi obtenu est filtré (filtre Millipore 0,45 µm) et utilisé pour doser les sucres réducteurs. La détermination de l'éthanol et des acides gras volatils est faite à partir des filtrats traités à l'acide sulfurique 6mM. Toutes les analyses sont répétées trois fois.

Mesure de l'acidité naturelle et du pH - Les mesures de l'acidité totale sont faites selon les méthodes usuelles [12] et le pH est déterminé avec le pHmètre Consort sur le prélèvement brut.

Dosage des sucres réducteurs, de l'éthanol, des acides gras volatils - L'analyse des sucres réducteurs est réalisée par HPLC (High performance liquid chromatography) à 20°C avec un chromatographe (LDC Analytical) muni d'une colonne à résine échangeuse

de cations (Aminex HPX-42) et relié à un réfractomètre différentiel (LDC refractomonitor IV) pour leur détection.

197

La phase mobile (solution d' H_2SO_4 6mM) a un débit de 0,8 ml min⁻¹. La détermination et le dosage de l'éthanol et des acides gras volatils sont faits également par HPLC, avec une colonne échangeuse d'ions Aminex HPX-87H: Bio-rad lab. Le débit de l'éluant (solution d' H_2SO_4 6mM) est de 0,40 ml min⁻¹. La température du four est de 65°C. Les produits organiques sont identifiés par un spectromètre UV (LDC spectromonitor 3100) à 210 nm.

RESULTATS

Dénombrement des germes - Les populations microbiennes mixtes sont en quantité variable selon les échantillons. Au bout de 24 heures de fermentation de vin frais, on note une diminution de la flore bactérienne totale dans tous les échantillons (Tableau I). Dans le même temps, on observe un développement rapide des levures (Tableau I), la baisse du pH consécutive à la fermentation étant favorable à ces dernières.

Table I - pH, flores bactérienne et levurienne totales en début et après 24 heures de fermentation

Echantillon (N°)	0 heure			24 heures		
	pH	Bactéries (x10 ⁷ /ml)	Levures (x10 ⁶ /ml)	pH	Bactéries (x10 ⁷ /ml)	Levures (x10 ⁶ /ml)
1*	3,9	150,0	0,5	3,5	60	27,5
2*	3,8	19,0	1,4	3,5	3,0	4,7
3*	3,4	1,3	1,2	2,8	0,08	60,0
4*	4,1	0,9	1,9	3,8	0,03	50,0
5*	3,7	34,0	20,0	3,5	4,1	26,0
6*	4,0	8,5	6,2	3,8	4,0	12,0
7*	3,9	1,3	4,6	3,8	1,2	10,0
8*	4,2	61,0	4,4	3,8	36,0	17,6
9*	4,8	80,0	5,0	4,0	60,0	29,5
10**	4,3	91,0	7,2	3,9	45,0	25,4
11**	4,1	49,0	9,1	3,7	23,0	36,7
12**	3,9	58,0	3,8	3,5	31,0	18,3

*Zone urbaine - **Zone rurale

Identification des germes - 195 souches ont été isolées des échantillons de vin des palmiers à huile de la zone urbaine. Les germes suivants ont été identifiés: *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium* spp., *Lactococcus lactis*, *Streptococcus* spp. et *Saccharomyces cerevisiae*.

Les 16 souches isolées de vin de palme de la zone rurale comprennent les microorganismes ci-après: *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus* spp., *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*. Le tableau II donne la fréquence des germes isolés. Il faut noter que les échantillons d'origines urbaine et rurale renferment pratiquement les mêmes bactéries avec les exceptions suivantes: *B. sphaericus* et *B. pumilus* sont présents uniquement dans le vin récolté en ville; *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pseudomonas fluorescens* n'existent que dans la boisson d'origine rurale; les *Zymomonas* et les *Lactobacillus* sont absents des échantillons d'origines urbaine et rurale; deux types de levures, *Saccharomyces cerevisiae* et *Hanseniaspora guilliermondii*, y sont présents.

198 Parmi les microorganismes identifiés, seuls paraissent importants par leur rôle *Lactococcus lactis* et *Saccharomyces cerevisiae*. Le rôle des autres germes (*Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Hanseniaspora*) reste à préciser.

Table II - Microflore du vin de palme

Micro-organismes	Nombre d'isolats	
	Vin ZU	Vin ZR
<i>Bacillus subtilis</i>	39	5
<i>Bacillus sphaericus</i>	13	0
<i>Bacillus pumilus</i>	13	0
Corynebactérie	39	2
<i>Hanseniaspora guillermondii</i>	0	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13	1
<i>Staphylococcus</i> spp.	0	3
<i>Streptococcus</i> spp.	52	0
<i>Strept. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	26	13
Total	195	26

ZU: zone urbaine - ZR: zone rurale

Evolution du pH et de l'acidité totale - Les valeurs de pH sont relativement faibles et restent pratiquement constantes (moins d'une unité de variation) au cours de la fermentation (Tabl. IIIa). L'acidité totale augmente également très faiblement au cours du temps (Tabl. IIIb).

Les différentes valeurs du pH et de l'acidité confirment le caractère aigrelet de la boisson.

Tableau III - Evolution au cours de la fermentation du pH (a) et de l'acidité totale (b) (moyenne et écart-type)

a	
Temps (heures)	pH
0	4,42 (0,52)
3	4,27 (0,38)
6	4,16 (0,31)
9	4,06 (0,30)
12	4,06 (0,30)
b	
Temps (heures)	Acidité (g d'acide lactique/l)
0	5,10 (1,95)
1	5,42 (1,82)
2	5,72 (1,79)
3	5,84 (1,78)
4	5,96 (1,87)
5	6,42 (1,80)
6	6,66 (1,70)
7	6,84 (1,75)
8	6,96 (1,73)

Evolution des sucres réducteurs - La teneur en sucres réducteurs (Tabl. IV) apparaît constante pendant les six premières heures. Au delà, on constate une diminution de leur concentration.

Production de métabolites - Les composés organiques identifiés pendant la fermentation sont essentiellement l'acide acétique, l'acide isobutyrique, l'acide isovalérique et l'éthanol. A l'exception de l'acide isovalérique dont la concentration reste constante, la teneur des autres produits augmente (Tableau IV).

Tableau IV - Evolution des concentrations (moyenne et écart-type) de différents métabolites au cours de la fermentation

Temps (heures)	Acide acétique	Acide isobutyrique	Acide isovalérique	Ethanol	Sucres réducteurs
0	2,68 (1,09)	0,59 (0,06)	0,34 (0,07)	1,33 (0,10)	0,50 (0,03)
3	3,054 (1,06)	0,45 (0,19)	0,45 (0,08)	1,23 (0,08)	0,50 (0,02)
6	3,05 (1,03)	0,95 (0,38)	0,45 (0,08)	2,38 (0,2)	0,49 (0,03)
9	3,55 (1,06)	0,89 (0,33)	0,56 (0,07)	2,29 (0,17)	0,37 (0,02)
12	3,95 (1,51)	0,91 (0,33)	0,42 (0,09)	3,27 (0,32)	0,30 (0,01)

DISCUSSION ET CONCLUSION

La flore microbienne du vin de palmier à huile (*Elaeis guineensis*) du Congo diffère de celle d'autres vins [7]. En effet, en ce qui concerne les levures, Van Pee [4] fait état de plusieurs espèces dont *Saccharomyces cerevisiae*. Dans notre étude, les espèces isolées sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Hanseniaspora guillermondii*. On remarque aussi que les bactéries lactiques comme les lactobacilles et les leuconostocs sont absents du vin congolais; tout comme *Zymomonas* souvent considéré comme jouant un rôle important sinon essentiel dans la production de CO₂, d'éthanol, de petites quantités d'acétaldéhyde, et d'acides lactique et acétique [13, 14, 15, 16]. L'absence de ces germes du vin congolais serait compensée par la présence de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Lactococcus lactis*, espèces non retrouvées dans d'autres vins de palme [1, 4, 7, 17, 18]. La présence de *Lactococcus lactis* ayant un faible pouvoir acidifiant par rapport aux lactobacilles expliquerait pour une part les faibles variations de pH observées, tandis que *Saccharomyces cerevisiae* assurerait, par la voie d'Entner - Meyerhof - Parnas, la fermentation alcoolique.

Il faut enfin constater l'absence de microorganismes tel *Acetobacter acetii* isolé par Okafor [9] du vin nigérien.

La microflore de vin de palme diffère donc largement selon les régions.

L'examen de l'évolution de la flore bactérienne totale indique, contrairement aux résultats de Okafor [6], une diminution de celle-ci après 24 heures. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que cette microflore soit plus sensible à la présence de l'alcool produit par les levures dont l'évolution est, par contre, la même.

La constance des teneurs en sucres réducteurs pendant les six premières heures ne peut être qu'apparente. En fait, il doit exister un équilibre permanent entre l'utilisation des sucres par les microorganismes et leur production à partir de l'hydrolyse des oligosaccharides tel le saccharose. Après la sixième heure, leur consommation l'emporterait sur leur production.

- 200 Le vin de palme apparaît comme un produit en constante transformation mettant en jeu des fermentations mixtes avec les bactéries et les levures.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Fondation Internationale pour la Science (FIS) pour le financement de cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BASSIR O. - Observations on the fermentation of palm-wine. *W. Afr. J. Biol. Appl. Chem.*, 1962, 6, 21-25.
- [2] FAPARUSI S.I., BASSIR O. - Factors affecting the quality of palm wine. *W. Afr. J. Biol. Appl. Chem.*, 1972, 15, 17-28.
- [3] STEINKRAUS K.H. - Handbook of indigenous fermented foods. M. Dekker (N.Y., Basel), 1983, 9, 315-328.
- [4] Van PEE W., SWINGS J.G. - Chemical and microbiological studies on Congolese palm wine (*Elaeis guineensis*). *East Afr. Agric. Food J.*, 1971, 36, 311-314.
- [5] FAPARUSI S.I. - Origin of initial microflora of palm wine from oil palm trees (*Elaeis guineensis*). *J. Appl. Bact.*, 1973, 36, 559-565.
- [6] OKAFOR N. - Preliminary microbiological studies on the preservation of palm wine. *J. Appl. Bact.*, 1975, 38, 1-7.
- [7] OKAFOR N. - Microbiology of Nigerian palm wine with particular reference to bacteria. *J. Appl. Bact.*, 1975, 38, 81-88.
- [8] OKAFOR N. - Palm-wine yeasts from parts of Nigeria. *J. Sci. Food Agric.*, 1972, 23, 1399-1407.
- [9] OKAFOR N. - The source of the microorganism in palm wine. *Nigerian Soc. for Microbiol. Proc.*, 1972, 1, 102-106.
- [10] PANDI A. - La place et le rôle du palmier dans la civilisation de l'ancien royaume Kongo du 15 au 19ème siècle. Mémoire de D.E.S. Université Marien Ngouabi, Brazzaville, 1984.
- [11] BOURGEOIS C.J.M., LARPENT J.P. - Les fermentations alimentaires. Techniques et documentations, Lavoisier (Paris), 1990.
- [12] MALONGA M. - Conditions de fabrication des yaourts en république populaire du Congo. Mémoire de D.E.A., 1983.
- [13] DADDS M.J.S., MARTIN P.A., CARR J.G. - The doubt status of the species *Zymomonas anaerobia* and *Zymomonas mobilis*. *J. Appl. Bact.*, 1973, 36, 531-539.
- [14] DAWES E.A., RIBBONS D.W., LARGE J.P. - The route of ethanol formation in *Zymomonas mobilis*. *Biochem. J.*, 1966, 98, 795.
- [15] SWINGS J., DE LEY J. - The biology of *Zymomonas*. *Bact. Rev.*, 1977, 5, 1-46.
- [16] DE LEY J., SWINGS J. - Phenotypic description numerical analyses and proposal for an improved taxonomy and nomenclature of the genus *Zymomonas* Kluyver and Van Niel. *Intern. J. System. Bacteriol.*, 1976, 4, 146-157.
- [17] OKAFOR N. - Microbiology and biochemistry of oil palm win. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1978, 24, 237-257.
- [18] NYAKO K.O. - Palm-wine, an alcoholic beverage of Ghana. Symposium of indigenous fermented foods (Bangkok, Thailand), 1977.

PUBLICATION N°3

ETUDE MICROBIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DU VIN DE PALME (*ELAEIS GUINEENSIS* JACQ) EN REPUBLIQUE DU CONGO

A. MALONGA ^(*), O. MAVOUNGOU ^(*), S.C. KOBAWILA ^(*), D. LOUEMBE ^(**)

PALM WINE: MICROBIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDY IN REPUBLIC OF CONGO

Summary

The types and numbers of organisms encountered vary widely even from three to three. 30 samples collected from *Elaeis guineensis* have been studied (urban area and country area). 210 cultures isolated have been identified: 44 *Bacillus subtilis*, 13 *B. sphaericus*, 13 *B. pumilus*, 29 *Lactococcus lactis*, 52 *Streptococcus* spp., 41 *Corynebacterium* spp., 3 *Staphylococcus* spp., 1 *Pseudomonas fluorescens*, 13 *Saccharomyces cerevisiae* and 1 *Hanseniaspora guilliermondii*.

B. sphaericus and *B. pumilus* are only presents in urban region. *Hanseniaspora* and *Pseudomonas* are recovered in the palm wine of country area. Numerous *Lactococcus lactis* never mentioned in literature have been isolated. *Zygomonas*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* which are often cited in literature have not been recovered. The pH varied from palm tree to palm tree, but for a given palm tree, pH changes in time (24 h) were very slight. Sugar levels also varied from tree to tree.

KEY-WORDS: Palm wine - *Lactococcus lactis* - *Saccharomyces cerevisiae* - *Zygomonas* - *Leuconostoc* - *Hanseniaspora guilliermondii* - Isobutyric acid - Lactic acid - Acetic acid - Ethanol.

INTRODUCTION

Parmi les boissons locales consommées au Congo, le vin de palme, obtenu par fermentation naturelle de la sève sucrée du palmier, reste une boisson très prisée. C'est un liquide blanchâtre, pétillant, à saveur sucrée et aigrelette, d'un goût assez agréable. Il est peu alcoolisé et contient 1,5 à 2,1 % d'éthanol [1]. Son pH varie entre 4 et 5 [2]. La concentration en sucres solubles de la sève du palmier varie entre 12 et 15%, le principal sucre étant le saccharose. On trouve également en faible quantité le glucose, le fructose, le raffinose, le maltose et les oligosaccharides [3]. La sève fermentée contient aussi des acides organiques et des acides aminés [4].

La flore microbienne du vin de palme est très diverse. Elle est constituée de bactéries lactiques, acétiques, de *Zygomonas* spp., de microzoques et de levures [5, 6, 7, 8, 9].

L'importance socio-économique de cette boisson dans notre pays [10] nous a conduits à étudier les caractéristiques microbiologiques de ce vin et à suivre l'évolution du pH, des sucres réducteurs et des métabolites produits au cours de la fermentation.

(*) Laboratoire de Biochimologie, Faculté des Sciences, B.P. 69, Brazzaville (Congo).

Échantillons - Vingt sept échantillons proviennent de trois palmiers à huile (*Elaeis guineensis*) situés sur le terrain de la Faculté des Sciences (zone urbaine). Un prélèvement est réalisé sur chaque palmier trois fois par semaine pendant trois semaines. Trois autres proviennent d'un palmier à huile en zone rurale. Un prélèvement est réalisé une fois par semaine durant également trois semaines. Les échantillons de sève sont récoltés dans des fioles stériles.

Préparation des échantillons pour les analyses microbiologiques - Immédiatement après chaque récolte, une série de dilutions décimales de l'échantillon est effectuée en eau peptonée stérile à 1% exempté d'indole.

Milieux et conditions de culture - Les milieux de cultures (11) utilisés sont les suivants: - Milieu au malt à 2% additionné de rose bengale à 1% pour les levures (culture à 37°C pendant 24 heures) - Plate Count Agar (P.C.A.) pour la microflore mésophile totale (culture à 30°C pendant 48 à 72 heures) - Glucose Yeast Agar (G.Y.A.) pour les *Zygomycetes* (culture en double couche à 25°C pendant 48 heures) - Gélose M.R.S. à pH 5,5-6 pour les bactéries lactiques (culture en double couche à 30°C pendant 48-72 heures) - Milieu de Terzaghi (M 17) pour les streptocoques lactiques (culture en double couche à 30°C pendant 48-72 heures). 0,1 ml de chacune des dilutions décimales est ensemencé sur les différents milieux en boîtes de Petri (3 boîtes pour chaque milieu). Après culture, les différentes colonies sont repiquées et conservées sur les milieux ci-après avant d'être identifiées: - Milieu trypticase soja (Bio Mérieux) - Milieu GYA - Milieu M.R.S. (Merck 106 69) - Milieu de Sabouraud (Bio Mérieux) - Milieu M 17 (Merck 15029).

Dénombrement et identification - Le dénombrement de la flore est fait sur douze échantillons (neuf échantillons de la zone urbaine et trois échantillons de la zone rurale). Il porte sur les bactéries totales et sur les levures développées après 24 heures, respectivement sur le milieu P.C.A. et sur le milieu au malt à 2% additionné de rose bengale. L'identification des souches isolées, à partir de tous les échantillons, est faite selon les méthodes usuelles (observation microscopique; coloration de Gram; recherche de la catalase, de l'oxydase, des spores, du type de métabolisme respiratoire) et en utilisant le matériel API SYSTEM (API 50 CII; API 20 E; API Strept; API Staph; API 20 NE).

Préparation des échantillons pour les analyses biochimiques - Après leur récolte, les échantillons sont incubés pendant 24 heures à la température ambiante de 25°C. Au cours de l'incubation, on réalise, toutes les 3 heures, un prélèvement de 10 ml de vin de palme à partir duquel on mesure le pH. Après mesure du pH, l'échantillon est centrifugé à 8000 tours / min. Le surnageant ainsi obtenu est filtré (filtre Millipore 0,45 µm) et utilisé pour doser les sucres réducteurs. La détermination de l'éthanol et des acides gras volatils est faite à partir des filtrats traités à l'acide sulfurique 6M. Toutes les analyses sont répétées trois fois.

Mesure de l'acidité naturelle et du pH - Les mesures de l'acidité totale sont faites selon les méthodes usuelles [12] et le pH est déterminé avec le pH-mètre Consort sur le prélèvement brut.

Dosage des sucres réducteurs, de l'éthanol, des acides gras volatils - L'analyse des sucres réducteurs est réalisée par HPLC (High performance liquid chromatography) à 20°C avec un chromatographe (LDC Analytical) muni d'une colonne à résine échangeuse

de cations (Aminex HPX-42) et relié à un réfractomètre différentiel (LDC refractromitra IV) pour leur détection.

La phase mobile (solution d' H_2SO_4 6mM) a un débit de $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. La détermination et le dosage de l'éthanol et des acides gras volatils sont faits également par HPLC, avec une colonne échangeuse d'ions Aminex HPX-87H; Bio-rad lab. Le débit de l'éluant (solution d' H_2SO_4 6mM) est de $0,40 \text{ ml min}^{-1}$. La température du four est de 65°C . Les produits organiques sont identifiés par un spectromètre UV (LDC spectromitor 3100) à 210 nm.

RESULTATS

Dénombrement des germes - Les populations microbiennes mixtes sont en quantité variable selon les échantillons. Au bout de 24 heures de fermentation de vin frais, on note une diminution de la flore bactérienne totale dans tous les échantillons (Tableau I). Dans le même temps, on observe un développement rapide des levures (Tableau I), la baisse du pH consécutive à la fermentation étant favorable à ces dernières.

Table I - pH, flores bactérienne et levurienne totales en début et après 24 heures de fermentation

Echantillon (N°)	pH	0 heure		24 heures		
		Bactéries ($\times 10^7/\text{ml}$)	Levures ($\times 10^6/\text{ml}$)	pH	Bactéries ($\times 10^7/\text{ml}$)	Levures ($\times 10^6/\text{ml}$)
1*	3,9	250,0	0,5	3,5	60	27,5
2*	3,4	12,0	1,5	1,5	1,0	4,7
3*	3,4	1,5	1,2	2,8	0,08	60,0
4*	4,1	0,9	1,0	3,6	0,03	50,0
5*	3,7	34,0	20,0	3,5	4,1	70,0
6*	4,0	0,5	5,2	2,8	4,0	12,0
7*	3,9	1,3	4,6	3,6	1,2	10,0
8*	4,2	51,3	4,6	2,8	35,0	17,6
9*	4,8	90,0	9,0	4,0	60,0	29,5
10**	4,3	91,5	7,2	3,9	45,0	24,4
11**	4,1	29,0	9,1	3,7	23,0	26,7
12**	3,9	54,0	1,8	3,5	11,0	18,3

* Zone urbaine - ** Zone rurale

Identification des germes - 195 souches ont été isolées des échantillons de vin des palmiers à l'huile de la zone urbaine. Les germes suivants ont été identifiés: *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium* spp., *Lactococcus lactis*, *Streptococcus* spp. et *Saccharomyces cerevisiae*.

Les 16 souches isolées de vin de palme de la zone rurale comprennent les microorganismes ci-après: *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus* spp., *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*. Le tableau II donne la fréquence des germes isolés. Il faut noter que les échantillons d'origines urbaine et rurale renferment pratiquement les mêmes bactéries avec les exceptions suivantes: *B. sphaericus* et *B. pumilus* sont présents uniquement dans le vin récolté en ville; *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pseudomonas fluorescens* n'existent que dans le boisson d'origine rurale; les *Zymomonas* et les *Lactobacillus* sont absents des échantillons d'origines urbaine et rurale; deux types de levures, *Saccharomyces cerevisiae* et *Hanseniaspora guilliermondii*, y sont présents.

198 Parmi les microorganismes identifiés, seuls paraissent importants par leur rôle *Lactobacillus lactis* et *Saccharomyces cerevisiae*. Le rôle des autres germes (*Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Hanseniaspora*) reste à préciser.

Table II - Microflore du vin de palme

Micro-organismes	Nombre d'isolats	
	Vin ZU	Vin ZR
<i>Bacillus subtilis</i>	25	5
<i>Bacillus sphaericus</i>	19	0
<i>Bacillus pasteurii</i>	19	0
<i>Corynebacterium</i>	28	2
<i>Hanseniaspora guillelmoensis</i>	0	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13	1
<i>Staphylococcus</i> spp.	0	3
<i>Streptococcus</i> spp.	52	0
<i>Strept. lactis subsp. diacetylactis</i>	25	13
Total	195	26

ZU: zone urbaine - ZR: zone rurale

Evolution du pH et de l'acidité totale - Les valeurs de pH sont relativement faibles et restent pratiquement constantes (moins d'une unité de variation) au cours de la fermentation (Tabl. IIIa). L'acidité totale augmente également très faiblement au cours du temps (Tabl. IIIb).

Les différentes valeurs du pH et de l'acidité confirment le caractère aigrelet de la boisson.

Tableau III - Evolution au cours de la fermentation du pH (a) et de l'acidité totale (b) (moyenne et écart-type)

a	
Temps (heures)	pH
0	4,42 (0,52)
3	4,27 (0,33)
6	4,26 (0,31)
9	4,06 (0,30)
12	4,06 (0,30)

b	
Temps (heures)	Acidité (g d'acide lactique/l)
0	5,10 (1,85)
1	5,42 (1,82)
2	5,72 (1,79)
3	5,96 (1,76)
4	5,95 (1,07)
5	6,42 (1,80)
6	6,66 (1,70)
7	6,84 (1,75)
8	6,95 (1,73)

Evolution des sucres réducteurs - La teneur en sucres réducteurs (Tahl. IV) apparaît constante pendant les six premières heures. Au delà, on constate une diminution de leur concentration.

Production de métabolites - Les composés organiques identifiés pendant la fermentation sont essentiellement l'acide acétique, l'acide isobutyrique, l'acide isovalérique et l'éthanol. A l'exception de l'acide isovalérique dont la concentration reste constante, la teneur des autres produits augmente (Tableau IV).

Tableau IV - Evolution des concentrations (moyenne et écart-type) de différents métabolites au cours de la fermentation

Temps (heures)	Acide acétique	Acide isobutyrique	Acide isovalérique	Ethanol	Sucres réducteurs
0	0,06 (0,06)	0,59 (0,05)	0,16 (0,00)	1,23 (0,10)	0,16 (0,01)
2	0,056 (0,05)	0,65 (0,19)	0,45 (0,06)	1,83 (0,30)	0,50 (0,02)
4	0,06 (0,03)	0,95 (0,28)	0,45 (0,06)	2,38 (0,22)	0,49 (0,03)
6	0,55 (1,05)	1,09 (0,33)	0,56 (0,07)	2,87 (0,37)	0,37 (0,02)
12	0,95 (1,51)	0,61 (0,22)	0,32 (0,02)	3,27 (0,22)	0,35 (0,01)

DISCUSSION ET CONCLUSION

La flore microbienne du vin de palme à huile (*Elaeis guineensis*) du Congo diffère de celle d'autres vins [7]. En effet, en ce qui concerne les levures, Van Pee [4] fait état de plusieurs espèces dont *Saccharomyces cerevisiae*. Dans notre étude, les espèces isolées sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Hanseniaspora guilliermondii*. On remarque aussi que les bactéries lactiques comme les lactobacilles et les leuconostocs sont absents du vin congolais; tout comme *Zymomonas* souvent considéré comme jouant un rôle important sinon essentiel dans la production de CO₂, d'éthanol, de petites quantités d'acétaldéhyde, et d'acides lactique et acétique [13, 14, 15, 16]. L'absence de ces germes du vin congolais serait compensée par la présence de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Lactococcus lactis*, espèces non retrouvées dans d'autres vins de palme [1, 4, 7, 17, 18]. La présence de *Lactococcus lactis* ayant un faible pouvoir acidifiant par rapport aux lactobacilles expliquerait pour une part les faibles variations de pH observées, tandis que *Saccharomyces cerevisiae* assurerait, par la voie d'Entner - Meyerhof - Parnas, la fermentation alcoolique.

Il faut enfin constater l'absence de microorganismes tel *Aerobacter acetii* isolé par Okafur [9] du vin nigérien.

La microflore de vin de palme diffère donc largement selon les régions.

L'examen de l'évolution de la flore bactérienne totale indique, contrairement aux résultats de Okafur [6], une diminution de celle-ci après 24 heures. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que cette microflore soit plus sensible à la présence de l'alcool produit par les levures dont l'évolution est, par contre, la même.

La constance des teneurs en sucres réducteurs pendant les six premières heures ne peut être qu'apparente. En fait, il doit exister un équilibre permanent entre l'utilisation des sucres par les microorganismes et leur production à partir de l'hydrolyse des oligosaccharides tel le saccharose. Après la sixième heure, leur consommation l'emporterait sur leur production.

200 Le vin de palme apparaît comme un produit en constante transformation mettant en jeu des fermentations mixtes avec les bactéries et les levures.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Fondation Internationale pour la Science (IIS) pour le financement de cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BASSIR O. - Observations on the fermentation of palm wine. *W. Afr. J. Biol. Appl. Chem.*, 1962, 6, 21-25.
- [2] FAPARUSI S.I., BASSIR O. - Factors affecting the quality of palm wine. *W. Afr. J. Biol. Appl. Chem.*, 1977, 15, 17-28.
- [3] STEINKRAUS K.H. - Handbook of indigenous fermented foods. M. Dekker (N.Y., Basel), 1983, 9, 315-328.
- [4] VAN FEE W., SWINGS J.G. - Chemical and microbiological studies on Congolese palm wine (*Elaeis guineensis*). *East Afr. Agric. Food J.*, 1971, 36, 311-314.
- [5] FAPARUSI S.I. - Origin of initial microflora of palm wine from oil palm trees (*Elaeis guineensis*). *J. Appl. Bact.*, 1973, 36, 559-565.
- [6] OKAFOR N. - Preliminary microbiological studies on the preservation of palm wine. *J. Appl. Bact.*, 1975, 38, 1-7.
- [7] OKAFOR N. - Microbiology of Nigerian palm wine with particular reference to bacteria. *J. Appl. Bact.*, 1975, 38, 81-89.
- [8] OKAFOR N. - Palm-wine yeasts from parts of Nigeria. *J. Sci. Food Agric.*, 1972, 23, 1398-1407.
- [9] OKAFOR N. - The source of the microorganisms in palm wine. *Nigerian Soc. for Microbiol. Proc.*, 1972, 1, 102-106.
- [10] PANDI A. - La place et le rôle du palmier dans la civilisation de l'ancien royaume Kongo du 15 au 19ème siècle. Mémoire de D.E.S. Université Marien Ngouabi, Brazzaville, 1984.
- [11] BOURGEOIS C.M., LARPENT J.P. - Les fermentations alimentaires. Techniques et Commercials. Lavoisier (Paris), 1990.
- [12] MALONGA M. - Conditions de fabrication des yaourts en république populaire du Congo. Mémoire de D.E.A., 1983.
- [13] DADDS M.L.E., MARTIN P.A., CARR J.G. - The doubt status of the species *Zygosaccharomyces auershaia* and *Zygosaccharomyces mobilis*. *J. Appl. Bact.*, 1971, 36, 531-539.
- [14] DAWES E.A., RIBBONS D.W., LARCE J.P. - The cause of ethanol fermentation in *Zygosaccharomyces mobilis*. *Microchim. J.*, 1965, 98, 795.
- [15] SWINGS J., DE LEY J. - The biology of *Zygosacchar.* *Bact. Rev.*, 1977, 5, 1-46.
- [16] DE LEY J., SWINGS J. - Phenotypic description, numerical analysis and proposal for an improved taxonomy and nomenclature of the genus *Zygosaccharomyces* and Van Niel. *Intern. J. System. Bacteriol.*, 1976, 4, 146-157.
- [17] OKAFOR N. - Microbiology and Biochemistry of oil palm wine. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1978, 24, 237-257.
- [18] NYAKO K.O. - Palm-wine, an alcoholic beverage of Ghana. Symposium of indigenous fermented foods (Bangkok, Thailand), 1977.

PUBLICATION N°4

ASPECTS MICROBIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DU ROUISSAGE DU MANIOC

M. MALONGA ^(*), O. MAYOUNGOU ^(*), S. KELEKE ^(**),
S.C. KOTAWILA ^(*), D. LOUESIBE ^(**)

MICROBIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF CASSAVA RETTING

Summary

Several physiological groups of microorganisms, which are primarily lactic acid, amylolytic and pectinolytic bacteria and yeasts, are involved in the fermentative process of cassava roots in water. These groups participate in the organoleptic properties of retted cassava roots by the production of ethanol, lactic, acetic, butyric, acetic and propionic acids, the main metabolites produced during the process. During fermentation, cassava roots pH decreases after 24 hours from 7 to about 4 at the end of process. Dissolved oxygen concentration shows a drastic drop from 5.54 mg/l to 0.4 within 12 hours so the fermentation medium becomes anaerobic. Amylulysis is very weak during the retting. Isolated amylolytic microorganisms include Bacillus (*B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. polymyxa*), Enterobacteria (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.) and lactic acid bacteria (*L. plantarum*, *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp.). Pectinolytic microorganisms are Actinomycetes and Streptococci. Cultured in cyanide medium, lactic acid bacteria isolated are resistant to free cyanide at a concentration higher than 200 ppm.

KEY WORDS: Cassava - Retting - Cyanide - Lactic acid bacteria - Amylolytic bacteria - Pectinolytic bacteria.

INTRODUCTION

Le manioc (*Manihot esculenta* Crauz) est le troisième aliment sous les tropiques, après le riz et le maïs du point de vue des quantités consommées. Il est une source importante de calories car il couvre 60% des besoins calorifiques journaliers des populations en Afrique tropicale et en Amérique centrale [1]. En Afrique centrale, notamment au Congo, le manioc est consommé principalement sous forme de farine (Foufou) ou de pain de manioc (Chikwangu).

Le manioc contient, dans les tubercules et les feuilles, du cyanure présent sous forme de glucosides cyanogéniques: la linamarine et la lotaustraline [2]. Pour éliminer l'acide cyanhydrique létal aux doses de 0,5 à 3,5 mg par kilogramme de poids corporel et rendre les tubercules propres à la consommation, les populations pratiquent une fermentation traditionnelle, appelée rouissage [3, 4, 5]. En outre, cette fermentation permet une production importante d'acides organiques et un ramollissement des tubercules,

(*) Laboratoire de Biochimologie, Faculté des Sciences, B.P. 69, Brazzaville (Congo).

(**) Laboratoire de Microbiologie et Chimie DGRST - ORSTOM, BP 181, Brazzaville (Congo).

indispensable pour les opérations ultérieures de transformation.

Les caractéristiques organoleptiques (couleur, texture, odeur, goût) dépendent du type de manioc, des conditions de rouissage et des microorganismes présents. La nécessité de maîtriser les qualités organoleptiques et hygiéniques du manioc roui passe donc par une meilleure connaissance du phénomène de rouissage notamment la dynamique des populations microbiennes.

Plusieurs travaux ont été consacrés aux microorganismes pour leur importance dans les qualités hygiéniques et organoleptiques du manioc roui [6, 7]. Mais ces travaux donnent peu d'indications sur l'évolution des principaux groupes microbiens impliqués dans le processus du rouissage.

Dans une étude antérieure [8] nous avons caractérisé les bactéries lactiques et montré leur évolution au cours du rouissage des tubercules de manioc. Le présent travail porte sur l'étude de l'évolution des groupes suivants: levures, bactéries pectinolytiques et amylolytiques. L'étude des principaux paramètres biochimiques (acides organiques, alcool) et physico-chimiques (pH, pO_2) a été faite parallèlement à la caractérisation de la microflore. Enfin une détermination de la sensibilité au cyanure des bactéries lactiques a été réalisée.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal - Les tubercules de manioc (*Manihot esculenta* var. Nganza) âgés de 18 mois proviennent des plantations d'Agri-Congo à Brazzaville. Cinq kilogrammes de tubercules de manioc sont lavés à l'eau du robinet, épluchés, coupés en morceaux et plongés dans des fûts contenant 20 litres d'eau de puits. Les fûts sont placés à température ambiante (28 à 30°C) durant 6 jours. Les prélèvements pour les analyses sont réalisés toutes les 24 heures pour l'étude des micro-organismes et des composés organiques et toutes les 12 heures pour les mesures du pH, de la pression d'oxygène dissous et du taux de sucres réducteurs.

Analyses microbiologiques - Dix morceaux de tubercules de manioc en cours de rouissage sont prélevés au hasard et découpés en petits dés. Soixante grammes de ces petits dés sont hachés et homogénéisés dans 540 ml d'eau peptonée stérile à l'aide d'un Waring blender. Des dilutions décimales en eau peptonée sont préparées à partir de cette suspension.

Milieux et conditions de culture - Les milieux et conditions de culture utilisés sont les suivants: - PCA (Plate Count Agar pour la flore mésophile totale; culture à 30°C pendant 48-72 heures - Milieu MRS gélosé à pH 5,5 pour les bactéries lactiques; ensemencement en double couche et incubation à 30°C pendant 48-72 heures - JP2, pH 6,7-6,8 pour les bactéries amylolytiques; ensemencement en surface et incubation à 28°C pendant 45-72 heures; pour la mise en évidence du pouvoir amylolytique, les boîtes sont exposées à des vapeurs d'iode pendant 5 à 10 minutes, l'activité amylolytique se révélant par la formation d'un halo autour de la colonie - PDA (Potatoes Dextrose Agar) acidifié à pH 5,5 avec de l'acide tartrique à 10% et additivé de chloramphénicol à 0,5% pour la sélection des levures et des moisissures; ensemencement en surface et incubation à 30°C pendant 72-120 heures - MRS-amidon additivé de bleu d'aniline à 2% pour les bactéries lactiques amylolytiques; après incubation à 30°C pendant 48-72 heures, toutes les colonies bleues, sans activité catalasique, présentant une plage d'hydrolyse d'amidon après exposition aux vapeurs d'iode sont comptées - milieu M'P [9] en boîte de Petri pour les bactéries pectinolytiques; incubation à 37°C en aérobie et en anaérobie pendant 4 à 5

jours; l'hydrolyse de la pectine se traduit par la présence de dépressions autour des colonies.

75

Dénombrement et identification - Les microorganismes sont dénombrés après culture selon la méthode de Miles et Misra décrite par Cullins et Lyne [10]; les milieux sont ensemencés avec 0.1 ml des différentes dilutions à raison de trois boîtes pour chaque dilution. Le résultat correspond à la moyenne des nombres de colonies développées (entre 30 et 300 colonies / boîte).

Après dénombrement, les colonies, prélevées à différents temps, sont purifiées et soumises aux tests physiologiques et biochimiques d'identification selon les méthodes décrites par Harrigan *et al.* [11]. L'identification des souches à partir des résultats de ces tests a été effectuée selon les données de Bergey's Manual [12] et à l'aide des différents catalogues API. L'identification des levures est conduite selon la clé de Barnett [13] et Lodder [14] à partir des caractéristiques culturales, morphologiques, sexuelles, physiologiques et des capacités d'assimilation et de fermentation des sucres (guillets API 20C, AUX).

Etude de la sensibilité au cyanure des souches de bactéries lactiques isolées - Six types de bactéries isolées ont été étudiées: *Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*. Les souches, ensemencées à raison de $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml, sont cultivées à 30°C sur bouillon MRS sans citrate, contenant des concentrations croissantes en cyanure de sodium (0; 25; 50; 100; 200; 400; 500; 600; 800 et 1000 ppm) et du bleu de bromothymol à 0,008%. Le pH du milieu est ajusté à 6,9. Trois tubes sont utilisés par concentration et par souche bactérienne. Après 48 heures d'incubation, la croissance des souches est notée pour chacune des concentrations en cyanure. La bactérie est sensible lorsque l'on n'observe ni culture ni virage de l'indicateur.

Analyses physico-chimiques et biochimiques

Mesure du pH de l'eau et des tubercules en cours de rouissage - Dix grammes de tubercules de manioc sont broyés à l'aide d'un Waring blender puis homogénéisés dans 90 ml d'eau peptonée stérile. La suspension obtenue est décantée. La mesure du pH de l'eau et de la suspension décantée est faite avec un pH mètre Consort selon les procédés décrits par Fleming *et al.* [15].

Mesure de la pression d'oxygène dissous - L'oxygène dissous est mesuré en plongeant l'oxymètre dans 50 ml d'eau de rouissage.

Dosages de sucres et d'acides organiques - Dix morceaux de tubercules de manioc en cours de rouissage sont prélevés au hasard et découpés en petits dés. Quarante grammes de ces petits dés sont placés dans 20 ml de H_2SO_4 0,006 M puis broyés à l'ultraturax. L'homogénéisat ainsi obtenu est centrifugé à 10 000 tours/min pendant 10 minutes. Le surnageant est filtré sur filtre Millipore (0,45 μm). Le filtrat est centrifugé à 15 000 tours/min. 20 μl du surnageant sont alors analysés par HPLC selon la méthode de McFecters *et al.* [16], en utilisant: colonne échangeuse d'ions Ammonex HPX87H, 300 \times 7,8 mm Biorad Co - Pompe: LDC analytical - Détecteurs: réfractomètre Philips PU 4026 pour les sucres et les alcools; spectrophotomètre UV LDC 3100 pour les acides organiques et autres molécules - Volume injecté: 20 μl - Phase mobile: acide sulfurique 6 mM - Débit: 0,40 ml/min - Température: 65°C - Solutions étalons des différents produits.

Caractéristiques physico-chimiques

pH - On observe (Fig. 1) une diminution rapide (des la 12ème heure) et importante du pH de l'eau de maïsage de 7,0 à 4,5. L'abaissement du pH des racines de manioc est tout aussi important, mais il débute un peu plus tard (à partir de la 24ème heure)

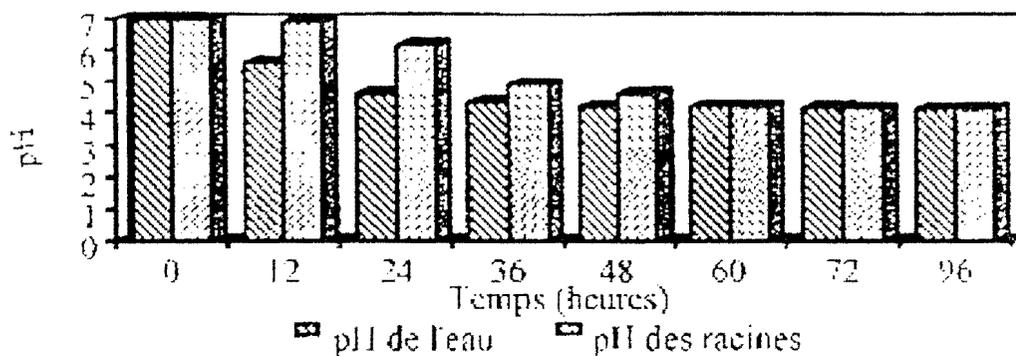


Figure 1 - Evolution du pH au cours de la fermentation

Oxygène dissous - On constate une disparition rapide et quasi totale de l'oxygène dissous dont la teneur passe, après 12 heures, de 5,2 à 0,1 mg/l. Ultérieurement le rouissage des tubercules se déroule en milieu ayant une faible teneur en oxygène.

Caractéristiques biochimiques

L'éthanol et les acides lactique, acétique, propionique et butyrique sont les principaux composés organiques identifiés au cours du rouissage (Fig. 2).

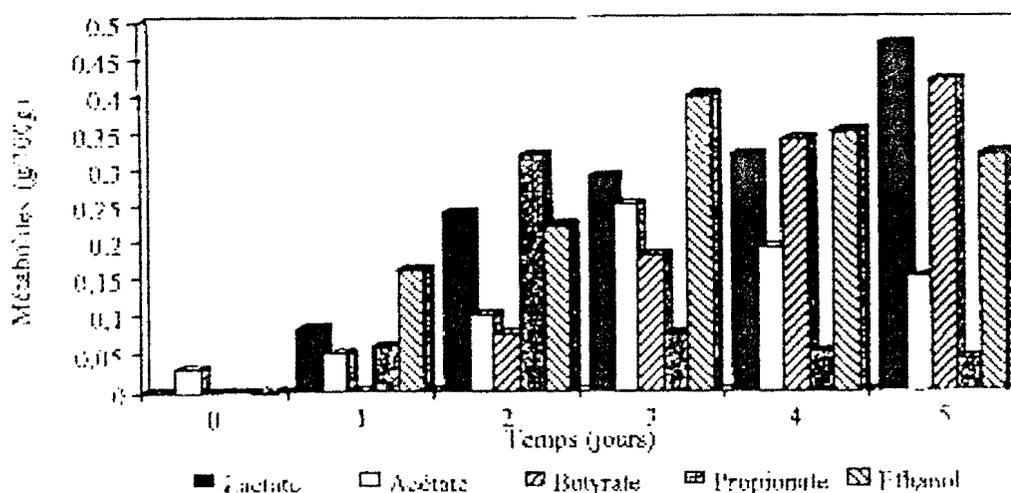


Figure 2 - Evolution de la concentration des acides organiques et de l'éthanol

L'éthanol est le seul alcool identifié au cours du rouissage. La concentration la plus élevée est observée le 5ème jour. Elle décroît par la suite.

Les acides lactique et butyrique sont quantitativement les métabolites les plus abondants. Leur concentration augmente pendant le rouissage. L'acide butyrique n'apparaît qu'à partir du 2ème jour. L'acide propionique est à l'état de traces. La concentration d'acide acétique augmente régulièrement jusqu'au 3ème jour et diminue ensuite.

En ce qui concerne les sucres, on observe (fig. 3) une disparition significative des sucres fermentescibles, notamment le saccharose. Ces sucres sont vraisemblablement assimilés ou fermentés. Le maltose et le maltotriose, produits de l'hydrolyse de l'amidon, sont présents en très faibles quantités. Ce fait indique la faible activité amylolytique du rouissage.

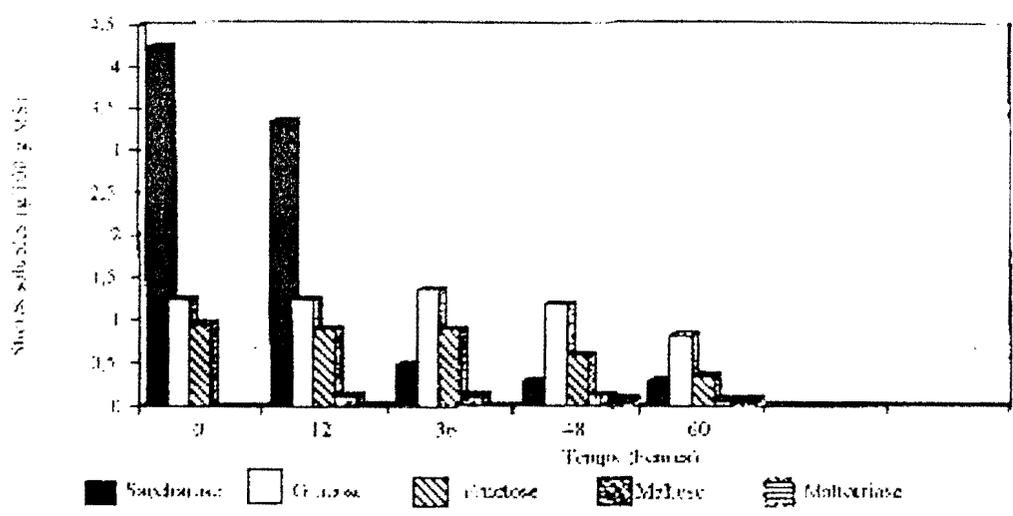


Figure 3 - Evolution des concentrations de sucres

Analyses microbiologiques

Dénombrement de la microflore - Les résultats relatifs à la microflore totale, aux levures ainsi qu'aux bactéries lactiques, amylolytiques et pectinolytiques sont présentés sur les figures 4 et 5.

La microflore amylolytique est présente pendant tout le rouissage. Son augmentation est très rapide les deux premiers jours. La densité maximale (10^7 bactéries/g de matière) est observée le 4ème jour. Le nombre élevé de ces bactéries pose le problème de l'importance de l'amylolyse pendant le rouissage.

La présence des bactéries pectinolytiques aussi bien aérobies qu'anaérobies est très significative en ce qu'elles contribueraient au ramollissement des tubercules de manioc. Les bactéries pectinolytiques aérobies disparaissent après le troisième jour, alors que les bactéries pectinolytiques anaérobies sont présentes pendant tout le rouissage. Leur croissance comprend une phase exponentielle durant les trois premiers jours et une phase semi-stationnaire les jours suivants.

L'évolution et l'abondance des bactéries lactiques définies au cours de la présente expérimentation sont en accord avec nos résultats antérieurs [8].

Les moisissures sont présentes uniquement les trois premiers jours et elles sont peu abondantes. Les levures sont dénombrées sur le manioc en rouissage à partir du 2ème jour. Leur population ne devient importante qu'à la fin du rouissage.

Caractérisation des microorganismes - Quatre-vingt-quatorze souches de bactéries montrant une activité amylasique révélée par des zones d'hydrolyse sur milieu contenant

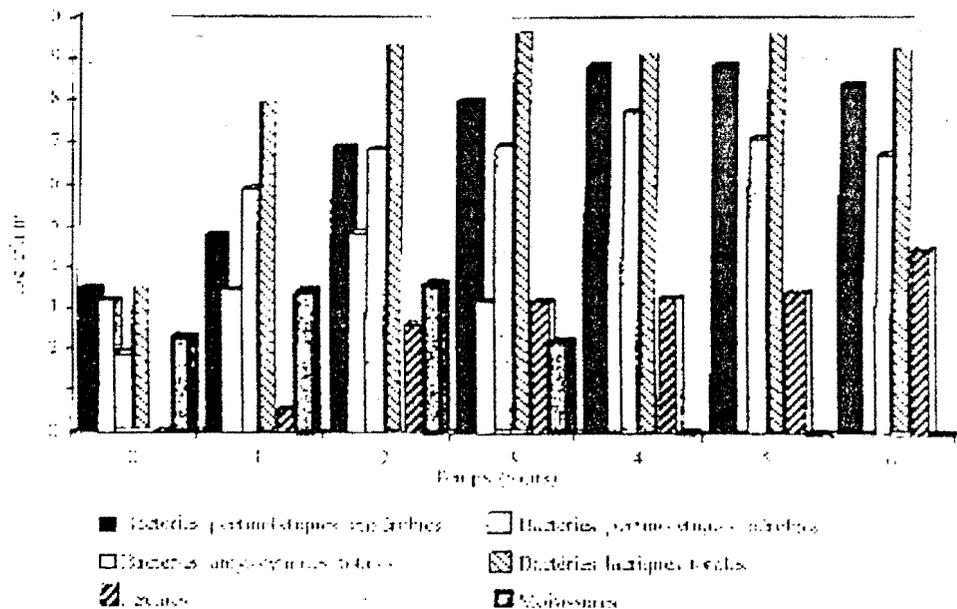


Figure 4 Evolution des différents groupes microbiens au cours du rouissage



Figure 5 - Evolution de la microflore lactique au cours du rouissage

de l'amidon, ont été identifiées: - 3 sont des bactéries lactiques dont 3 *L. plantarum*, 6 *Lactobacillus* spp. et 4 *Lactococcus* spp. - 68 sont des *Bacillus* dont 13 *B. cereus*, 14 *B. amyloliquefaciens*, 16 *B. polymyxa* - 8 des entérobactéries avec 6 *Alcaligenes* spp. et 2 *Enterobacter* spp.

L'étude de 162 souches de bactéries peptidolytiques isolées au cours de 72 heures de rouissage, à partir de milieu de culture PEP en double couche a permis d'identifier 73 Actinomycètes et 19 *Streptococcus* spp.

Les levures appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et au genre *Candida*. Il est à noter l'absence d'activités amylolytique et peptidolytique chez les levures isolées.

Résistance des bactéries lactiques au cyanure - Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau I. Les bactéries lactiques isolées ont une remarquable capacité à résister à de fortes concentrations de cyanure libre. Par ordre croissant de résistance, on note respectivement: *Lactobacillus coprophilus* (200 ppm), *Lactobacillus delbrueckii* (200 ppm), *Lactobacillus fermentum* (400 ppm), *Leuconostoc mesenteroides* (500 ppm), *Lactobacillus plantarum* (600 ppm) et *Lactococcus lactis* (800 ppm).

Tableau I - Sensibilité au cyanure des souches de bactéries lactiques

Microorganismes testés	Concentration maximale tolérée (ppm)
<i>Lactobacillus coprophilus</i>	200
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	200
<i>Lactobacillus fermentum</i>	400
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	500
<i>Lactobacillus plantarum</i>	600
<i>Lactococcus lactis</i>	800

DISCUSSION

La faible teneur en oxygène dissout (0,1 mg/l), obtenu dès les premières heures, montre que le rouissage des tubercules de manioc immergés est un phénomène anaérobie comme l'ont signalé Onyekwere *et al.* [6]. Ces conditions permettent le développement des microorganismes micro-aérophiles dépourvus de chaîne respiratoire comme les bactéries lactiques qui constituent la flore majoritaire ainsi que nous l'avons montré dans une précédente étude [8].

La présence de sucres fermentescibles (saccharose, glucose, fructose) est significative. Elle permet, comme l'indiquent Daeschel *et al.* [17], la multiplication des différentes populations microbiennes, en particulier la flore lactique, qui par la production d'acides organiques comme l'acide lactique est responsable de la diminution du pH observée au cours du rouissage. Cette diminution est en accord avec les résultats obtenus par Oyejole *et al.* [18].

L'éthanol, produit principalement par les levures et les bactéries lactiques hétérofermentaires, contribue, à côté d'autres composés volatils, à la saveur du produit final [19].

L'apparition de l'acide butyrique à partir du deuxième jour coïncide avec le début du ramollissement des tubercules de manioc. Il serait responsable de la saveur caractéristique du produit. Sa production peut provenir soit d'une fermentation clostridienne butyrique, soit d'une fermentation due aux levures. Cette dernière hypothèse semble la plus probable car les Clostridies se développent mal en milieu acide. Les levures, souvent associées aux bactéries lactiques [18, 20, 21, 22], ont, par contre, un métabolisme important en anaérobiose et à pH acide et leur apparition au cours de notre étude coïncide avec l'apparition de l'acide butyrique. Elles jouent donc un rôle indéniable dans les caractéristiques organoleptiques du produit final [23].

Les moisissures ne se développent que les trois premiers jours et disparaissent. La diminution du pH à 4 et de la pression d'oxygène dissout à 0,1 mg/l, au cours du rouissage, constitue des conditions défavorables à leur développement [20].

La microflore amylolytique est quantitativement abondante mais elle n'hydrolyse que très peu l'amidon comme l'indiquent les très faibles quantités de maltose et maltotriose.

- [14] LODDER J. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. North Holland Publ. Co. (Amsterdam), 1970.
- [15] FLEMING H.P., McFEEFERS R.F., ETCHELLS J.L., BELL T.A. - Pickled vegetables. Compendium of methods for the microbial examination of foods. Amer. Health Ass., Washington, DC, 2nd ed., 1984.
- [16] McFEEFERS R.F., THOMPSON R.J., FLEMING H.P. - Liquid chromatographic analysis of sugars, acid, and ethanol in lactic acid vegetable fermentations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1984, **67**, 715.
- [17] DAESCHER M.A., FLEMING H.P., McFEEFERS R.F. - Mixed culture fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeast. *J. Food Sci.*, 1988, **53**, 862-864.
- [18] OYEWOLE O.B., ODUNFA S.A. - Microbiological studies on cassava fermentation for 'lafun' production. *Food Microbiol.*, 1988, **5**, 125-133.
- [19] ADE M.O., LINDSAY R.C. - Evidence for a clostridial role in Nigerian acidic cassava (*Manihot esculenta* Linn.) fermentation. *J. Food Protection*, 1977, **41**, 981-984.
- [20] ODUNFA S.A., ADEYELE S. - Microbiological changes during traditional production of ogishaba, a West African fermented sorghum drink. *J. Food Sci.*, 1985, **3**, 136-139.
- [21] WOOD B.J.D. - *Lactobacillus*-yeast interactions in sourdough and fermented breadstuffs, especially tritic and bread. *Sourd Culture Fermentation*, Academic Press, London, 1981, 146-150.
- [22] VENKATASUBRAHAI P., DWARAKANATH C.T., MURTY V.S. - Inhibition of yeast flora in 'idli' by a bactericidal agent. *J. Food Sci. Technol.*, 1985, **22**, 88-90.
- [23] SPINKRAUS K.H., VAN VEEN A.G., THEUREAU D.R. - Studies on 'idli' - an Indian fermented food grain rice cake. *Food Technol.*, 1987, **21**, 915-919.
- [24] HOBSON G.E. - Pectinesterase in normal and abnormal tomatoes. *Biochem. J.*, 1963, **86**, 358.
- [25] HOBSON G.E. - Polygalacturonase in normal and abnormal tomatoes. *Biochem. J.*, 1964, **92**, 394.
- [26] GRIERSON D., TUCKER G.A.R. - The molecular biology of ripening. In E. FRIEND (ed.), *Recent Advances in Biochemistry of Fruit and Vegetables*. Academic Press, London, 1981.
- [27] GIRAUD L. - Contribution à l'étude physiologique et enzymatique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* métabiotique isolée du moineau fermenté. Thèse, Université de Provence Aix-Marseille I, 1993.
- [28] KNOWLES C.J. - Microorganisms and cyanide. *Bacteriol. Rev.*, 1976, **40**, 652-680.
- [29] VASCONCELOS A.T., TWIDDY D.R., WESTBY A., REILLY P.J.A. - Detoxification of cassava during garri preparation. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 1993, **25**, 198-200.

PUBLICATION N°5

ETUDE MICROBIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DE LA BOUILLIE DE MAÏS, "POTO-POTO"

D. LOUEMBE (**), A. BRAUMAN (**), F. TCHICAYA (*), S.C. KOBAWILA (*)

MICROBIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES OF THE MAIZE PORRIDGE "POTO-POTO"

Summary

Sour cereal porridge making has three major phases: soaking of grains; grinding; decantation. Physico-chemical, microbiological and biochemical parameters indicate that the soaking stage must be considered as a pre-fermentation stage: slow acidification of grains, weak concentration of lactic bacteria and reduced rate of production of lactate. Decantation is the real fermentation stage of the process: high concentration of lactic bacteria (10^{13} bacteria/100 mg dry weight), rapid acidification (pH 3,5 in less than 10 hours), very low oxygen pressure and a high production of metabolites such as lactate (39 mg/100 g dry weight). Amylolysis observed during fermentation is not significant. Final product, the porridge, is very acid due to the presence of organic acids. This acidity inhibits the development of enterobacteria.

KEY WORDS: Maize - Lactic acid bacteria - Amyolytic bacteria - Amylolysis - Ethanol - Lactic acetic and propionic acids.

INTRODUCTION

En Afrique, le maïs (*Zea mays*) est transformé en plusieurs produits parmi lesquels la pâte fermentée. Obtenue selon un procédé extrêmement long et fastidieux [1], cette pâte est appelée "uji" ou "akama" au Kenya [2], "ogi" au Nigeria [3], "koko" ou "akasa" au Ghana [4], "mahewu" en Afrique du Sud [5] et "poto-poto" au Congo où il est utilisé particulièrement pour la préparation des bouillies de sevrage (47% de la population en zones rurales et 78% à Brazzaville) [6].

Malgré de nombreuses études portant sur la microflore, les produits organiques libérés ainsi que les possibilités d'amélioration [1], ce produit pose toujours de nombreux problèmes: qualités organoleptiques très variables [7, 8, 9]; valeur nutritionnelle très pauvre [6]; encombrement digestif, facteur étiologique de malnutrition chez les jeunes enfants [10]; présence dans plusieurs cas d'une microflore de contamination.

Dans le présent travail, notre objectif est de déterminer les principales étapes de la fermentation, l'incidence réelle de celle-ci sur la qualité microbiologique du produit et

(*) Laboratoire de Microbiologie et Biotechnologies Alimentaires, Faculté des Sciences, B.P. 3029, Brazzaville, Brazzaville (Congo).

(**) Laboratoire de Microbiologie Usages IGRST - ORSTOM, B.P. 181, Brazzaville (Congo)

246 L'importance de la dégradation de l'amidon au cours du processus fermentaire. La connaissance précise de l'évolution des mécanismes microbiologiques et biochimiques des processus se déroulant pendant la production du poto-poto pourrait permettre de proposer des solutions simples, applicables à l'échelle artisanale, pour l'élaboration d'un produit de meilleure qualité.

Nous avons donc étudié la cinétique des paramètres microbiologiques (bactéries lactiques, entérobactéries, bactéries amylolytiques, levures), biochimiques (sucres, alcools, acides organiques) et physico-chimiques (pH, pO_2 , température, matière sèche) pendant la production du poto.

MATERIELS ET METHODES

Matériel végétal - Il est constitué de grains de maïs secs (variété blanche) provenant de marchés de Brazzaville.

Préparation du "poto-poto" - Le procédé de préparation du poto-poto par l'atelier de production retenu pour notre étude est représenté sur la figure 1. La première étape de la fabrication consiste à tremper les grains de maïs dans l'eau pendant 21 heures. A la fin du trempage, les grains de maïs égouttés sont broyés au moulin. La farine obtenue est défibrée par tamisage à l'eau à travers un tissu en mousseline. Le lait d'amidon est recueilli et décanté pendant 15 heures. Après décantation, la pâte obtenue est mise dans un sac en toile et soumise à un égouttage pendant trente minutes.

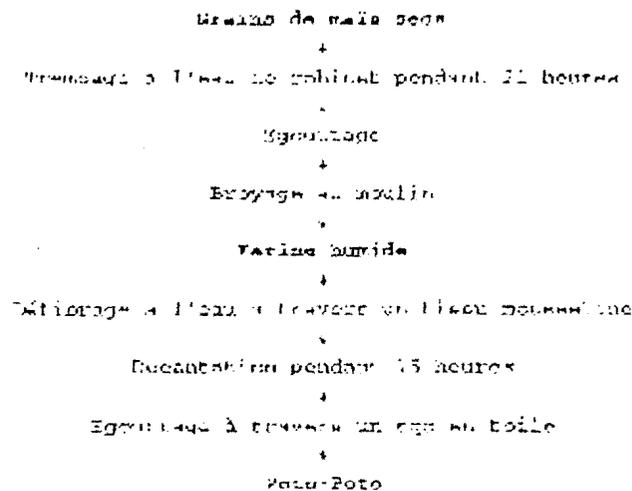


Figure 1 - Procédé de fabrication du Poto-Poto

L'étude des différents paramètres de la fermentation du maïs est réalisée à chaque étape de la production (grains; farine humide; lait d'amidon en décantation). La codification des échantillons est la suivante:

G 0: Grains secs au moment du trempage - G 7: Grains après 7 heures de trempage - G 14: Grains après 14 heures de trempage - G 21: Grains après 21 heures de trempage

F.H.: Farine humide après broyage des grains - P 0: Pâte défibrée au moment de la décantation - P 5: Pâte défibrée après 5 heures de décantation - P 10: Pâte défibrée après 10 heures de décantation - P 15: Pâte défibrée après 15 heures de décantation.

L'analyse de chacun des échantillons est répétée trois fois.

Matière sèche - Chaque échantillon est pesé avant d'être mis à l'étuve à 105°C. Après 48 heures, ils sont retirés et pesés.

Mesure du pH - Vingt grammes d'échantillon en suspension dans 120 ml d'eau distillée sont broyés à l'aide d'un Waring blender. Le broyat ainsi obtenu est filtré sur papier filtre Whatman GF/A. Le volume du filtrat recueilli est ajusté à 200 ml avec de l'eau distillée. La mesure du pH est réalisée selon les procédés décrits par Fleming, *et al.* [14].

Mesure de la température - Elle est réalisée avec un thermomètre à pointe "Quick Nixzo, Bio Block".

Mesure de la pression d'oxygène dissous - L'oxygène dissous est déterminé à l'aide d'un oxymètre (type Oxy 9) WTW, de WTW, Germany).

Dosage des sucres, des acides gras volatils et des alcools - Quarante grammes d'échantillon à analyser sont broyés en présence de 20 ml d'une solution de H₂SO₄ 0,006 M un Waring blender. L'homogénéisat ainsi obtenu est centrifugé à 10 000 tours/min pendant 10 minutes. Le surnageant est filtré sur membrane Millipore (0,45 µm). Des dilutions de mélanges de solutions de référence d'acides organiques, d'alcools et de sucres (1 à 0,8 g/l) sont traitées de la même manière que les échantillons. 20 µl du surnageant sont alors analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC thermo Separation Product) selon la méthode de McFeters *et al.* [16] dans les conditions suivantes: Colonne échangeuse d'ions Aminex HPX-87H, 300 7,8 mm. Biorad Co. Pompe LDC analytical - Détecteurs: réfractomètre Philips PU 4026 pour les sucres et les alcools et spectrophotomètre UV LDC 3100 pour les acides organiques - Phase mobile: acide sulfurique 6 mM dégazé et filtré à travers une membrane Millipore 0,45 µm Débit: 0,40 ml/min - Température du four: 65°C - Solutions de référence pour l'identification des différents composés (sucres, acides organiques et alcools).

Analyses microbiologiques

Notre étude a porté sur les entérobactéries, indicatrices de la qualité hygiénique des différentes étapes de préparation, les bactéries lactiques, les bactéries amylolytiques, les levures et les moisissures du fait de leur importance dans les processus de fermentation.

Préparation des échantillons - Soixante grammes de produit à analyser sont broyés et homogénéisés dans 240 ml d'eau peptonée stérile à l'aide d'un Waring blender. Des dilutions décimales en eau peptonée sont préparées à partir de cette suspension.

Milieu et conditions de culture - Les milieux et conditions de culture utilisés sont les suivants: - PCA (Plate Count Agar) pour la flore mésophile totale; culture à 30°C pendant 48-72 heures - Milieu MRS gélosé, pH 5,5 pour les bactéries lactiques; ensemencement en double couche et incubation à 30°C pendant 48-72 heures - NAA (Nutrient agar amidon soluble, Sigma), pH 6,7-6,8 pour les bactéries amylolytiques; ensemencement en surface à l'aide de billes de verre et incubation à 30°C pendant 48-72 heures; pour la mise en évidence du pouvoir amylolytique, les boîtes de Petri sont exposées à des vapeurs d'iode pendant 5 à 10 minutes, l'activité amylolytique se révélant par la formation d'un halo autour de la colonie - PDA (Potatoes Dextrose Agar) acidifié à pH 3,5 avec de

248 l'acide tartrique à 10% et additionné de chloramphénicol à 0,5% pour la sélection des levures et des moisissures; ensemencement en surface et incubation à 30°C pendant 72-120 heures - MRS-amidon additionné de bleu d'induline à 2% pour les bactéries lactiques amylolytiques; après incubation à 30°C pendant 48-72 heures, toutes les colonies bleues, sans activité catalasique, présentant une plage d'hydrolyse d'amidon après exposition aux vapeurs d'iode sont comptées - EMB (Géloseéosine bleu de méthylène) pour les entéro bactéries, culture à 37°C pendant 24-48 heures en anaérobiose.

Dénombrement - Les différents microorganismes étudiés sont dénombrés après culture selon la méthode de Miles et Misra décrite par Collins et Lyne [12]: les boîtes de Petri sont ensemencées avec 0,1 ml des différentes dilutions en raison de trois boîtes pour chaque dilution. Le résultat correspond à la moyenne des nombres de colonies comptées sur chaque boîte (entre 10 et 100 colonies).

RESULTATS

Evolution des paramètres physico-chimiques

pH - Au cours du trempage (fig. 2), le pH baisse fortement: il passe de 7,6 à 4,4. Après défibrage à l'eau courante, il remonte à 6,4. Pendant la décaitation, on observe une nouvelle diminution très rapide du pH à 3,5.

Oxygène dissous - La pO_2 présente les mêmes variations (fig. 2): elle passe de 5,4 mg/l à 2 mg/l pendant le trempage. Elle remonte à 5,4 mg/l au cours du défibrage et baisse à nouveau à 1,1 mg/l à la fin de la décaitation.

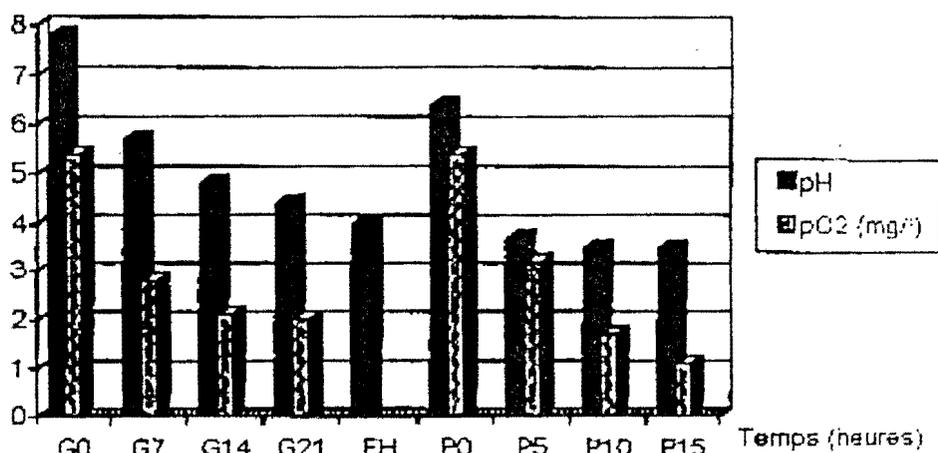


Figure 2 - pH et pO_2 au cours de la fabrication

Température - Elle reste relativement stable au cours du trempage (23°C) et de la décaitation (27°C). La différence de température observée entre ces deux étapes pourrait traduire une différence dans le niveau d'activité fermentaire. A l'étape du broyage, sa valeur s'élève à 56,5°C (Fig. 3).

Matière sèche - La transformation du maïs en pâte s'accompagne d'une perte de matière sèche (fig. 4). Sa valeur passe de 86 à 63% pendant le trempage et de 63% à 41% après broyage, défibrage et décaitation.

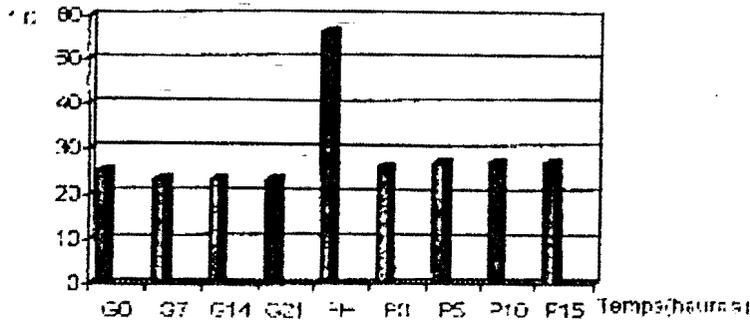


Figure 3 - Température au cours de la fabrication

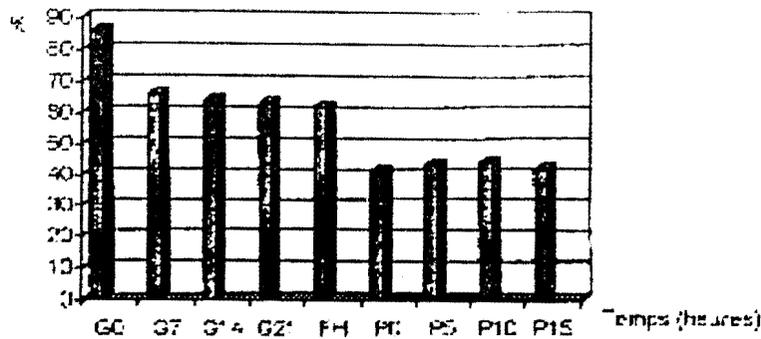


Figure 4 - Taux de matière sèche au cours de la fabrication

Evolution des caractéristiques biochimiques

Acides organiques - Le lactate constitue le produit le plus important de la fermentation à côté des acides acétique et propionique (fig. 5).

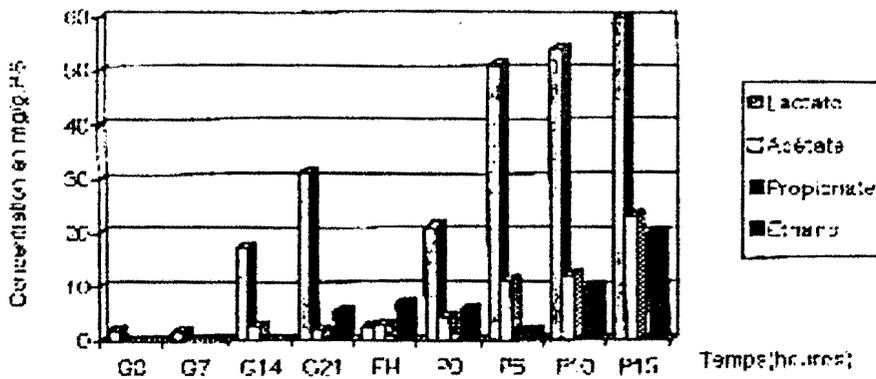


Figure 5 - Taux de composés organiques

Sucres et alcools - Les concentrations en fructose et glucose diminuent faiblement au cours de la première étape (trempage). Pendant la décantation, tout le fructose est consommé et le glucose reste le seul sucre présent, bien qu'en quantité faible (fig. 6). Les concentrations des polysides intermédiaires (mallopentose, maltohexose, maltoheptose, maltotriose, maltose), caractéristiques de la dégradation de l'amidon sont faibles. On ne retrouve plus de maltose ni de maltotriose dans la pâte en décantation (fig. 7).

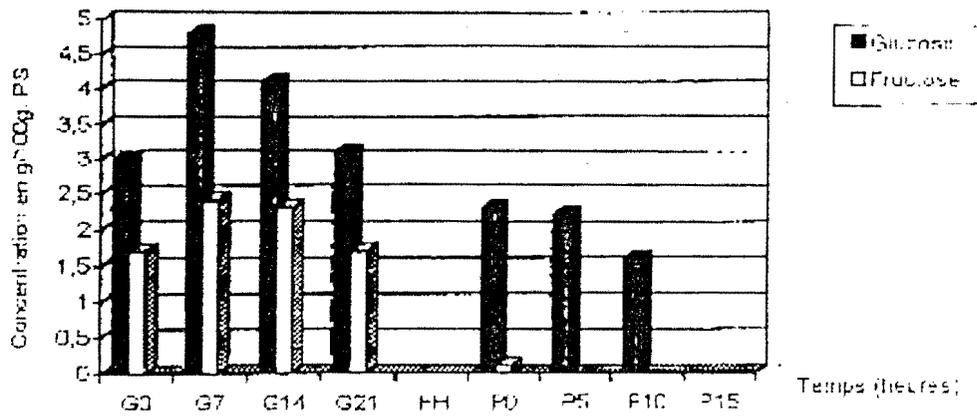


Figure 6 - Concentration du glucose et du fructose

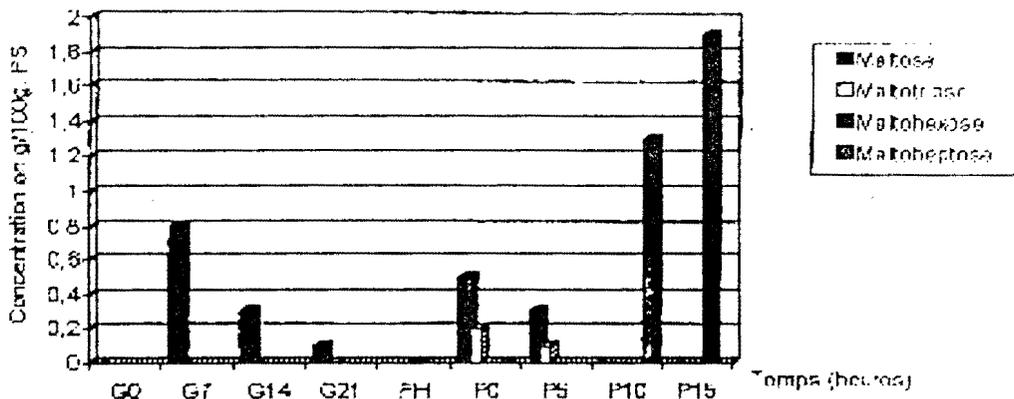


Figure 7 - Evolution des concentrations de glucides au cours de la fabrication

L'éthanol est le seul alcool identifié (fig. 5). Sa teneur augmente au cours du processus.

Evolution des paramètres microbiologiques

L'évolution des principaux groupes de microorganismes caractérisés au cours du processus de fermentation est représentée sur les figures 8 et 9.

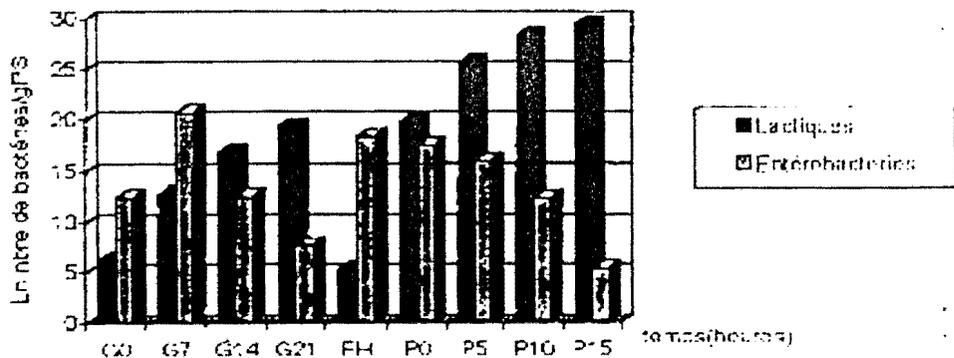


Figure 8 - Concentration des bactéries lactiques et entérobactéries

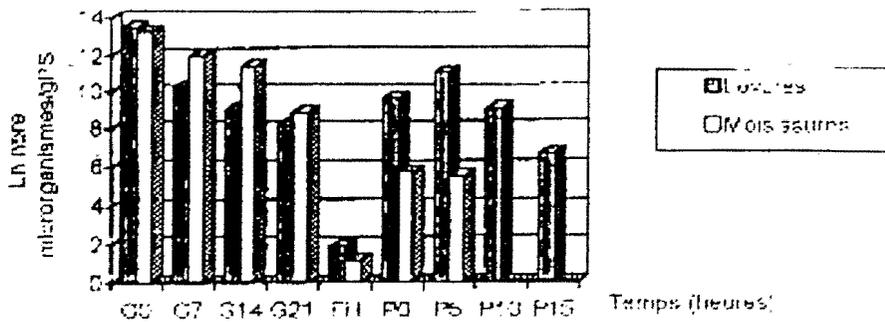


Figure 9 - Concentration des levures et moisissures

Bactéries lactiques - Leur concentration est de $4.6 \cdot 10^2$ bact./g PS au moment du trempage. Cette population augmente progressivement au cours de cette phase, sa valeur maximale est de $2.5 \cdot 10^6$ bact./g PS à G21 (grains de maïs trempés pendant 21 heures). Pendant l'étape de broyage, on observe une forte diminution de cette population ($2.1 \cdot 10^2$ /g PS).

Pendant la décantation, l'augmentation de la population lactique est très importante ($5.2 \cdot 10^{12}$ bact./g PS). L'évolution de la quantité des bactéries lactiques est en accord avec l'acidification du milieu et la diminution de la pression $d'O_2$ (fig. 2).

Entérobactéries - Leur évolution est contraire à celle des bactéries lactiques au cours du trempage, après une augmentation rapide (de 10.5 à $9.7 \cdot 10^8$ bact./g PS), leur nombre décroît jusqu'à $1.2 \cdot 10^3$ bact./g PS. Une augmentation de la population est observée ensuite après broyage. Pendant la décantation, cette population diminue avec la baisse du pH (fig. 8) et l'augmentation du nombre des bactéries lactiques.

Levures et moisissures - Leur nombre au moment du trempage est respectivement de 10^6 et 10^7 par g PS. Cette microflore diminue progressivement et disparaît dans la farine humide (FH). Elle réapparaît au cours de la décantation. Les levures deviennent abondantes dans la pâte après 5 heures de décantation (P5) et décroissent ensuite tandis que les moisissures disparaissent ultérieurement.

Flore amylolytique - Elle est très importante après 7 heures de trempage des grains (G7) mais décroît au cours du trempage (5, $8 \cdot 10^5$ à $1.9 \cdot 10^3$ bact./g PS). Pendant la décantation, leur nombre, élevé au départ (P0) diminue également par la suite ($3 \cdot 10^5$ à $5 \cdot 10^3$ bact./g PS).

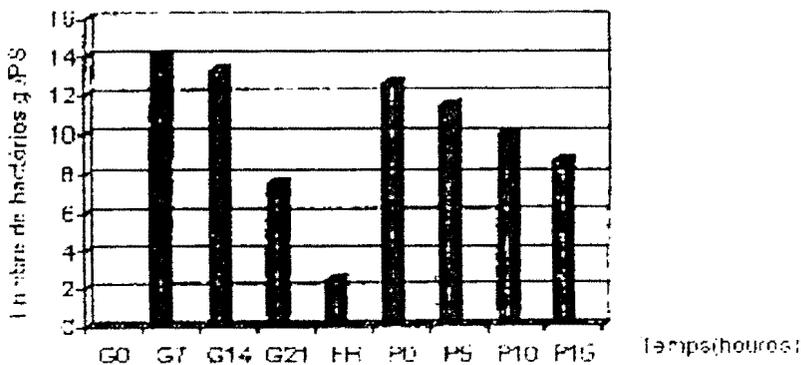


Figure 10 - Concentration des microorganismes amylolytiques

Du point de vue physico-chimique, la transformation de maïs en *poté-poté* se fait dans un environnement acide (pH 3,5). Une autre caractéristique de ce procédé est l'installation très rapide de conditions anaérobies, dues probablement à la consommation de l'oxygène dissous dans l'eau par la microflore épiphyte. L'instauration de conditions d'anaérobiose et d'acidité est un paramètre important pour comprendre l'évolution des populations microbiennes. Par ailleurs, ces conditions qui sont particulièrement plus marquées durant la décantation traduisent une activité fermentaire plus intense lors de ce stade. Ce fait est dû probablement à une meilleure accessibilité du substrat à la microflore à la suite du broyage.

Les températures observées au cours du trempage (22°C) et de la décantation (27°C) confirment la différence d'activité microbienne entre les deux phases. La disparition significative des sucres (maltose, glucose, fructose) est secondaire, comme l'indiquent Daeschel *et al.* [13], à la multiplication des microorganismes.

Les quantités de polysides intermédiaires, quoique très faibles, indiquent une certaine activité amylolytique. Cette dégradation qui ne paraît pas être significative, comme le confirment les résultats obtenus par Mbugua [8], reste cependant suffisante pour la libération des sucres, constituant, selon Oteog Gyung et Amortye [14], les substrats de la croissance des microorganismes.

Le nombre très élevé des bactéries lactiques au cours de la décantation montre qu'elles constituent la flore dominante et importante du processus. Des observations similaires ont été également rapportées par Odunla [15]. L'évolution des bactéries lactiques traduit la différence d'activité au cours des deux phases. La prédominance de lactate et d'acétate pendant la décantation confirme également l'existence des deux phases.

Contrairement à ce qu'indiquent certains auteurs [16, 17], les levures ne semblent pas représenter une flore prépondérante dans le processus, mais leur rôle reste important pour l'arôme et le goût du produit [3].

Le produit final (*poté-poté*) est très acide du fait de la présence d'acides organiques. La concentration très élevée des bactéries lactiques est en accord avec l'importante acidité qui est responsable de l'inhibition du développement de la flore indésirable tel que les entérobactéries. Elle préserve donc cet aliment de la contamination microbienne. Les travaux de Akinceli [3], de Okator [16], de Mensah [18] et de Adams [19], qui montrent que l'acidité de la pâte élimine les bactéries pathogènes comme les entérobactéries, sont en accord avec les résultats obtenus. Mbugua *et al.* ont également montré que les coliformes, très abondants durant les 24 premières heures de fermentation, disparaissent par la suite. Les lactobacilles, devenus dominants, produisent suffisamment d'acide qui entrave la multiplication des coliformes.

La réapparition des coliformes observée est le résultat de recontaminations provenant des mauvaises conditions d'hygiène des ateliers, des instruments de travail et, enfin, des manipulateurs, comme le signale Rowland [21].

La perte importante de matière pourrait être à l'origine de la diminution des éléments nutritifs et expliquerait en partie la pauvreté du *poté-poté* en protéines car les enveloppes ou les teguments riches en protéines ont été retirés [9].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] STEINKRAUS R.H., CHILLEN R.B., PERDERSON C.S., NELLIS L.F., GAVITT B.K. - Handbook of Edible Ferments, Food Microbiology series, 1983, vol. 9. Marcel Dekker Inc. (N. Y. and Basel).

- [2] ABINGBALA J.O., BORENEY L.W., FAUBION J.M. - A laboratory procedure for preparation of *ogi*, a Nigerian fermented food. *J. Food Sci.*, 1981, 46, 1323-1326.
- [3] AKINRELE I.A. - Fermentation studies on maize during the preparation of a traditional African garri-cake food. *J. Sci. Agric.*, 1991, 21, 619-625.
- [4] ANBAJI A., MÜLLER H.G. - Studies on *kofo*, a Ghanaian fermented maize porridge. *Ghana J. Agric. Sci.*, 1973, 6, 63-70.
- [5] SCHWEIGART F., DE WIT J.P. - Food as beverage of the Bantu. Processing and drying the umbewit and its nutritional value. *Food Indus. S. Africa*, 1961, 12, 25-27.
- [6] TRECHE S., GIAMARCHI F., GAILLON U., MASSAMBA J. - Les boissons de savrage au Congo, composition, valeur nutritionnelle et modalités d'utilisation. Séminaire international au Centre Montpellier, 23-27 Novembre 1992.
- [7] AKINRELE I.A., EDWARDS C.C.A. - An assessment of the nutritive value of a maize-soya mixture *Soy-Ogi*, as a weaning food in Nigeria. *Bot. J. Natl.*, 1971, 26, 177-185.
- [8] MBUNGA S.B. - Microbial and biochemical aspects of Uji (a East African sour based porridge) fermentation, and its enhancement through application of lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis, Cornell University, 1981.
- [9] DOUVIER M. - Étude de mode de fermentation des mollards de fabrication de "pau-pau" à Brazzaville. Mémoire de DESS, Université de Montpellier II, 1992.
- [10] DRANITZAEV D., MALFISHI N.G., SAVANBERG U., DESIKACHAR J.S.R., MELLANDER O. - Dietary intake as a limiting factor for nutrient intake in preschool children. III - Sources of raised blood iron from iron-sufficient weaned young. *J. Trop. Pediatrics*, 1981, 29, 184-189.
- [11] FLEMING H.P., McFETHERS R.F., FICHELLS J.L., BELL T.A. - Pickled vegetables. Comparison of methods for mesophilic examination of foods. Amer. Health Ass., Washington, DC, 2nd edn., 1984.
- [12] COLLINS C.H., LYNE P.M. - Microbiological methods (4th edn.), Butterworths (London), 1979.
- [13] DASCHEI M.A., FLEMING H.P., McFETHERS R.F. - Mixed culture fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeasts. *J. Food Sci.*, 1988, 53, 862-864.
- [14] UTING-GYANG K.O., ANTHONY U.C. - Biochemical studies of the fermentation of cassava (*Mandiocola esculenta* Pohl), *Acta Biotechnol.*, 1987, 3, 267-269.
- [15] ODUNFA S.A., ADEYELE S. - Microbiological changes during the traditional production of *Ogi* (haha), a West-African fermented sorghum grain. *J. Food Sci.*, 1985, 3, 175-180.
- [16] OKAFOR I.N., OYOLI C. - Study on cassava setting for food production. *J. Appl. Bacteriol.*, 1984, 56, 1-12.
- [17] OYEWOLE G.B., ODUNFA S.A. - Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during its production. *J. Appl. Bacteriol.*, 1992, 68, 145-152.
- [18] MENSAH P.A., KIMKINS A.M., DRASER D.S., HARRISON T.J. - Effect of fermentation of Ghanaian maize dough on the survival and proliferation of *S. aureus* of *Staphylococcus faecalis*. *Trans. Royal Soc. for Trop. Medicine and Hygiene*, 1988, 82, 655-656.
- [19] ADAMS M.R., HALL C.J. - Growth inhibition of broad-spectrum pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Intern. J. Food Sci. Technol.*, 1988, 23, 287-292.
- [20] MBUNGA S., NIENGA J. - Antimicrobial properties of fermented Uji as a weaning food. In *Traditional African Foods - Quality and Nutrition*, IFS, 1991, 63-67.
- [21] ROWLAND M.G.M., BARRELL R.A.E., WHITEHEAD R.G. - Bacterial contamination in traditional Gambian weaning foods. *Lancet*, 1978, 1, 135-138.

PUBLICATION N°6

EVOLUTION DE LA TENEUR EN COMPOSES CYANES DES TUBERCULES DE MANIOC AU COURS DU ROUISSAGE - ACTIVITE LINAMARASIQUE DE BACTERIES LACTIQUES

D. LOUEMBE ^(*), M. MALONGA ^(*), S.C. KOBAWILA ^(*), O. MAYOUNGOU ^(*)

CYANIDE CONTENT OF CASSAVA TUBERS DURING RETTING LINAMARASIC ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA

Summary

Cassava tubers traditional retting is efficient in tubers detoxification since the cyanide content is reduced by more than 80%.

During retting, pH and dissolved oxygen pressure of water drop rapidly, respectively from 7.2 to 4.6 and from 5.3 to 0,05 mg/l. However, pH of the tubers falls less rapidly probably because of their buffer effect.

These physico-chemical conditions and softening of tubers which facilitates the contact between the linamarase and the cyanogenic glucosides seem indispensable for the detoxification which is whole the 4th day.

Linamarin dissociation will be subordinate of enzyme and pH effects. In a first time it is due to enzymatic activity and subsequently to acidic conditions.

KEY-WORDS: Lactic acid bacteria - Linamarase - Cyanogenic glucosides - Linamarin - Retting - Cassava

INTRODUCTION

Les tubercules de manioc constituent dans les pays tropicaux un aliment énergétique de base [1]. Mais ils contiennent des cyanoglucosides [2], principalement la linamarine et la lotaustraline [3] dans un rapport de 93:7 [4]. Ces composés cyanogéniques possèdent un goût amer et sont responsables de la toxicité des tubercules non treués [5, 6].

Pour éliminer ces composés cyanogéniques, les populations du Congo, par une expérience accumulée depuis des temps très anciens, ont recourus à la pratique du rouissage dans l'eau. Cette élimination se ferait par conversion des cyanoglucosides en cyanohydrine et cyanure libre [7]. Cette pratique permet, en outre, le ramollissement des racines [8] et la production de composés nouveaux qui donnent au produit fini ses caractéristiques organoleptiques [9].

Pour pouvoir améliorer la qualité des produits finis et envisager un traitement contrôlé des tubercules, il est apparu nécessaire de déterminer l'efficacité de ces techniques ancestrales dans la réduction de la teneur des composés cyanés, d'établir les caractéristiques physico-chimiques du processus et de préciser les mécanismes mis en jeu.*

^(*) Faculté des Sciences, Département de Microbiologie et Biotechnologie Alimentaires, B.P. 5829, Brazzaville, Congo.

Si beaucoup d'études ont été consacrées à la microbiologie du rouissage [9, 10, 11] et au phénomène de ramollissement [3, 11, 12], la compréhension de la détérioration reste encore très controversée et aucune conclusion définitive relative au mécanisme de détérioration ne peut être retenue [13, 14, 15].

Dans le présent travail, nous avons étudié l'évolution du pH, de la pression d'oxygène, de l'indice de pénétromètre des tubercules de manioc et de la teneur en cyanures totaux au cours du rouissage traditionnel pour tenter de définir les mécanismes de détérioration. Nous avons, par ailleurs, déterminé la capacité des bactéries lactiques à produire la linamarine.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal - Il est constitué de tubercules de manioc (*Manihot esculenta*, variété Ngarisi) âgés de 18 mois provenant des plantations d'Agri-Congo situées à 45 km au nord de Brazzaville. Cinq kilogrammes de tubercules sont trempés à l'eau du robinet et épluchés.

Incubation et prélèvements - Les tubercules sont placés pendant 8 jours dans des fûts contenant 20 litres d'eau de puits à température ambiante (28 - 32°C). Les prélèvements sont réalisés durant le rouissage toutes les 12 heures pour la détermination des différents paramètres.

Détermination du pH - Soixante grammes de tubercules de manioc en fermentation sont broyés au Waring blender puis homogénéisés dans 100 ml d'eau distillée stérile. Le broyat est filtré sur papier filtre Whatman GF/A de 9 cm de diamètre. Le pH du filtrat est mesuré avec un pH-mètre Consort P307. La détermination du pH de l'eau de rouissage est réalisée à partir d'un échantillon de 10 ml selon les mêmes conditions.

Détermination de la pression d'oxygène dissous (PO₂) - La teneur en oxygène dissous est déterminée à partir de 5 ml d'eau de rouissage à l'aide de l'oxymètre (type Oxy 91 WTW, Germany).

Détermination des taux de composés cyanés - Les taux de linamarine, des cyanohydrines et des cyanures libres sont déterminés suivant la méthode de Ceske [15] modifiée par Giraud *et al.* [16].

Détermination du ramollissement - L'état de ramollissement est apprécié par pénétrométrie. Le pénétromètre utilisé est de type PRN 10 Beclin. Le protocole expérimental employé est celui décrit par Ampe *et al.* [3].

Isolément et identification des bactéries lactiques à activité linamarasique

Préparation de la suspension-mère - Dix morceaux de tubercules de manioc en cours de rouissage sont prélevés au hasard et découpés en petits dés. Soixante grammes de ces petits dés sont broyés et homogénéisés dans 540 ml d'eau peptonée stérile à l'aide d'un Waring blender. Des dilutions décimales en eau peptonée sont préparées à partir de cette suspension et 0,1 ml de ces dilutions est ensemencé sur les différents milieux de culture en boîtes de Petri à raison de trois boîtes par dilution.

Milieux et conditions de culture - Les milieux et conditions de culture utilisés sont les suivants: - PCA (Plate Count Agar) pour la flore mésophile totale; culture à 30°C pen-

dans 48-72 heures. Milieu MRS gélosé, pH 5,5 pour les bactéries lactiques; ensemencement en double couche et incubation à 30 °C pendant 48-72 heures.

Isolément et identification - Les boîtes sont ensemencées selon la méthode de Miles et Mira décrite par Collins et Lyne [17]. Après culture, les colonies, prélevées au hasard à différents temps, sont purifiées et soumises aux différents tests physiologiques et biochimiques d'identification selon les méthodes décrites par Harrigan *et al.* [18]. L'identification des souches à partir des résultats de ces tests a été effectuée d'après Buchanan *et al.* [19] à l'aide des différents catalogues AIC.

Conservation des souches bactériennes - La collection de souches validées est conservée à -80°C dans 20% de glycérol stérile (p/e). Les bactéries lactiques sont ensemencées en petites quantités dans la gélose MRS Difco à 15% et les bactéries sensibles le sont en trypticase sans agar supplémenté avec 0,6% d'extrait de levure. Les souches en streak sont utilisées après 2 cultures de relance en bouillant approprié.

Détermination de l'activité linamarsique - Elle a été déterminée selon la méthode décrite par Okafor et Ejirofor [20]. Cette méthode consiste à faire agir l'extrait enzymatique à étudier sur un substrat, le para nitrophenol D glucoside (PNPG) dans un tampon phosphate à pH 6,8. L'enzyme (β -D glucosidase) provoque la rupture de la liaison li du PNPG en donnant une molécule d'hexose libre et une molécule de para nitrophénol (PNO) qui absorbe à 400-450 nm. L'activité est recherchée après culture des souches bactériennes à tester sur MRS cellulosique. Ce milieu a été choisi comme substrat pour induire chez les bactéries la synthèse de la linamarase qui est une β -D glucosidase.

RÉSULTATS

Evolution du pH

Au cours du rouissage, une diminution progressive et appréciable du pH est observée dans les échantillons analysés (figure 1). Le pH passe de 7,2 à 4,2 en 4 jours.

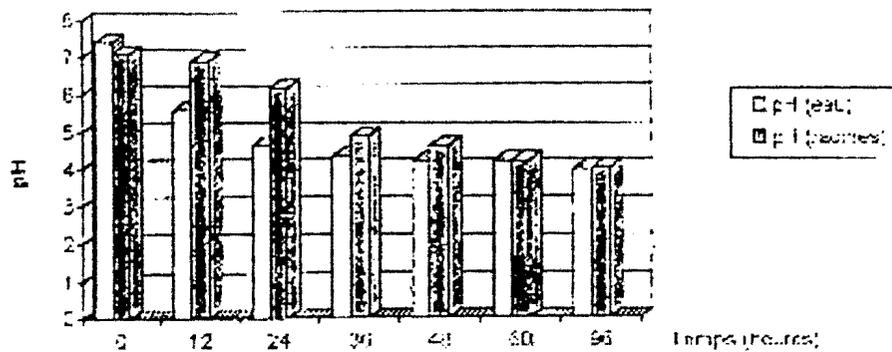


Figure 1 - Evolution du pH au cours du rouissage

Evolution de la teneur en oxygène dissous

La pression d'oxygène dissous baisse fortement. Elle décroît de 5,3 à 0,05 mg/l après 12 heures. Cette valeur reste constante jusqu'à la fin du rouissage (figure 2).

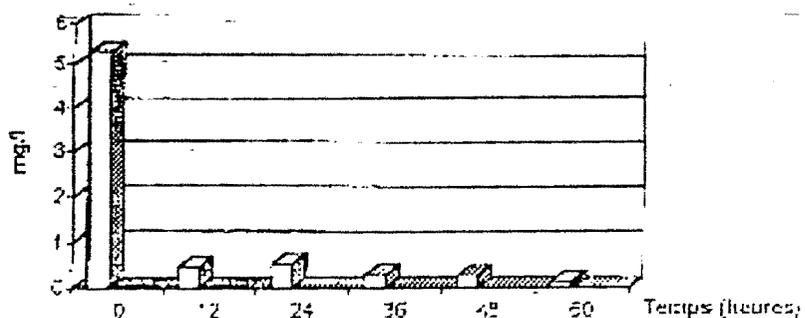


Figure 2 - Evolution de la pression d'oxygène dissous

Ramollissement

La courbe d'évolution de l'indice de pénétrométrie qui caractérise le ramollissement est représentée à la figure 3.

Le diagramme montre deux phases: une phase de latence de 24 heures et une phase de ramollissement des tubercules à partir de la 24^{ème} heure de fermentation. À la 96^{ème} heure, l'indice de pénétrométrie est de 23,67. Cela correspond à un ramollissement important.

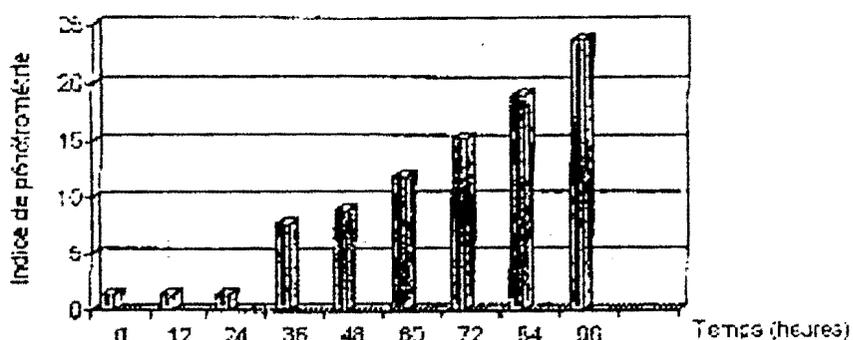


Figure 3 - Evolution du ramollissement des tubercules

Concentrations en composés cyanés

La teneur totale des composés cyanés dans les tubercules frais est de 414 ppm.

La vitesse de dégradation des cyanoglucosides augmente à partir du deuxième jour de rotissage au moment où le ramollissement s'accroît. Au bout de 4 jours de fermentation, la teneur résiduelle est de 93 ppm, ce qui traduit la dégradation des cyanoglucosides: isomarine et isomarinine (figure 4).

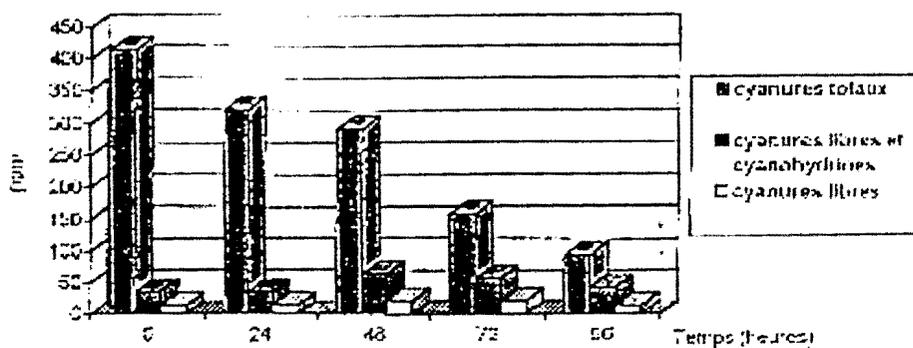


Figure 4 - Evolution des teneurs en composés cyanés

Le cyanure libre est en quantité infime. Sa concentration ne varie pas de façon significative pendant le processus.

Il y a donc une réduction appréciable des teneurs en composés cyanés à la fin du mouillage.

Identification des bactéries lactiques

Au cours du mouillage, 74 souches de bactéries lactiques ont été isolées et identifiées. Elles appartiennent aux espèces suivantes: *Lactococcus lactis* (45 souches), *Lactomonas mesenteroides* (22 souches), *Lactobacillus plantarum* (5 souches), *Lactobacillus* présentant des caractères atypiques (2 souches).

Identification des bactéries lactiques productrices de linamarase

Parmi les souches de bactéries lactiques possédant une activité linamarasique, on note 25 souches de *Lactococcus lactis*, soit 57% des soucs isolés, 19 souches de *Lactomonas mesenteroides*, soit 86%, 2 souches de *Lactobacillus plantarum*, soit 40% et 1 souche de *Lactobacillus* sp. (Tableau 1). On doit donc relever la proportion importante de bactéries lactiques ayant la faculté de dégrader la linamarine. Ceci indique que l'élimination des composés cyanogéniques est assurée, au moins en partie, par l'action des enzymes bactériennes.

Tableau 1 - Souches bactériennes productrices de β -glucosidase

Mal de mouillage		Activité β -glucosidase (μ Moles/min/g)	
étudiées	productrices de β -glucosidase	Moyenne	Valeurs extrêmes
<i>Lactococcus lactis</i>			
45	25	6,20	0,02-10
<i>Lactomonas mesenteroides</i>			
22	19	25,31	0,00-2700
<i>Lactobacillus plantarum</i>			
5	2	5,00	1,21-11,66
<i>Lactobacillus</i> sp.			
2	1	1,20	

DISCUSSION

Le mouillage se caractérise d'une manière physico-chimique par une acidification progressive du milieu (pH 4,5 en moins de trois jours) et une instauration très rapide de conditions anaérobies (teneur en oxygène très faible, égale à 0,05 mg/l au moins de 11 heures). Ces résultats sont en accord avec ceux indiqués dans la littérature [9, 11, 21]. Il sont à mettre en relation avec la présence majoritaire des micro-organismes anaérobies et producteurs d'acides organiques [9, 22].

La teneur en cyanoglucosides des racines fraîchement récoltées est de 450 ppm. Dans la littérature [21, 24, 25], ces teneurs varient en fonction des variétés étudiées entre 117 et

1515 ppm. Selon les données obtenues, le mouillage traditionnel des tubercules de manioc dans l'eau permet effectivement une réduction significative de ces toxéens. Il est ainsi un procédé très efficace dans l'élimination des composés cyanés cadavériques des tubercules de manioc. Nos résultats confirment ceux obtenus par Aghor Egbe *et al.* [25] selon lesquels les toxéens en cyanure passent de $401,9 \pm 50,2$ mg à $133,7 \pm 10,4$ mg HCN/kg.

Malgré l'abondance des travaux effectués pour la compréhension du mécanisme de la détoxication, l'élimination de la linamarine, principal composé cyanogénique, se fait selon un mécanisme qui reste très controversé. Selon certains auteurs [26], c'est le pH acide dû à la production d'acides organiques par les micro-organismes au cours de la fermentation qui provoquerait le clivage spontané de la linamarine, l'activité de la linamarase étant très réduite à pH 4,5. Cependant, d'autres expérimentateurs, en montrant que la diminution du pH augmente la stabilité de la cyanohydrine [27, 13, 28, 29], infirment cette hypothèse et proposent que l'hydrolyse des composés cyanés serait plutôt due à l'action des linamarases bactérienne et végétale [4, 30, 31, 32].

Il paraît vraisemblable que la dégradation des composés cyanogéniques au cours du mouillage se ferait selon deux mécanismes se complétant dans le temps. Dans un premier temps, les glucosides cyanogéniques sont hydrolysés en cyanohydrine par les linamarases endogènes ou bactériennes dont l'optimum d'activité est compris entre 6,5 et 8,2 [33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40]. Dans un deuxième temps, il se produirait une hydrolyse spontanée des composés cyanogéniques à partir de pH 4,5. A cette étape, l'action des linamarases serait très limitée en raison de leur inactivation par le pH devenu trop acide.

Les cyanohydrines sont à leur tour dégradées spontanément ou par d'autres enzymes comme l'hydroxynitrile lyase [41] pour donner l'acide cyanhydrique.

Les taux d'acide cyanhydrique posteur après hydrolyse des glucosides cyanogéniques sont contradictoirement très faibles. Ceci pourrait provenir de la volatilisation spontanée de ces composés dès leur formation, leur température d'évaporation étant de 26,7°C.

Leuconostoc mesenteroides et *Streptococcus faecalis* participent au processus de détoxication au cours de la première étape pour trois raisons. Ces bactéries constituent, comme nous l'avons montré, la microflore naturelle des deux premiers jours de mouillage [42]; elles sont résistantes à des concentrations très élevées de cyanures (plus de 500 ppm de CN [43]); une proportion élevée de ces bactéries, comme l'indiquent les résultats obtenus, présente une activité β -glucosidique.

La détoxication serait donc liée à l'action conjointe mais séparée dans le temps des enzymes (linamarases) et du pH. Elle commencerait par la voie enzymatique et, suite à l'inactivation des enzymes impliquées par la diminution du pH, elle se poursuit par l'action des acides organiques résultant du métabolisme des bactéries lactiques. Elle exige, par ailleurs, que le ramollissement soit assez avancé, autrement dit que les tissus soient dans un état de dégradation très prononcée. En effet, l'examen des courbes d'évolution de l'indice de pénétration et de disparition des cyanoglucosides révèle que la phase d'accélération du ramollissement coïncide avec la phase d'accélération de la vitesse d'hydrolyse des cyanohydrines. Le ramollissement qui débute à la 36ème heure sous l'action de plusieurs enzymes pectinolytiques cadavériques et bactériennes comme la polygalacturonase, les pectates et pectines lyases, les pectine méthylestérases [44, 45] va permettre, après destruction des structures cellulaires, une meilleure accessibilité des enzymes de dégradation aux glucosides cyanogéniques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] COCKE J.H. - Cassava: a basic energy source for the tropics. Science, 1982, 218, 755-765.

- [2] NARTEY F. - Studies on cassava *Manduca arizonana* Poell. Cytoplasts: the biosynthesis of beta-mannan and lichenaric acid related staining. *Mycolochemistry*, 1968, 7, 1407-1513.
- [3] DUNSTAN W.R., HENRY T.A., AULD S.J.M. - Cytoplasts in plant. The occurrence of phloem-inhabiting cassava (*Manduca arizonana*) and *Manduca arizonana*. *Proc. Roy. Soc. London*, 1966, 78, 152-58.
- [4] RUTTER G.W., BAILEY R.W., KENNEDY L.D. - Studies on the glucosylase "ligninase". *Phytochemistry*, 1965, 4, 355-381.
- [5] HOWLITT W.P., BRUDAKER G.R., MLINGI N.L.V., BOSLING H. - An epidemic type of root rot disease studied in Tanzania. *Phytopathology*, 1963, 53, 223-233.
- [6] MLINGI N.L.V., ASSELY Y.D., FOLTIER N.H., BOSLING H. - Cassava root borer (infectiously processed cassava) and its control: a newly identified harmful disease in manioc in Africa. REELEY (ed.), *Proc. Regional Workshop on Plant Diseases of Tropical Africa - Quality and Nutrition*. Foundation for Science, 25-29 November 1981, 163-169.
- [7] CHUN L.L. - *Cytoplasts*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1969, 17, 1945-26.
- [8] AMPE F., BRAUMAN A., TRECHE S., ANDRESSOU A. - The fermentation of cassava (c) in a study by the experimental research methodology. *J. Sci. Food Agric.*, 1974, 65, 335-36.
- [9] OKAFOR N., IHOMA B., OYOLE C. - Studies on microbiology of cassava rooting for the root production. *J. Appl. Bacteriol.*, 1984, 56, 1-13.
- [10] OYEWOLE O.B., ODUNFA S.A. - Microbiological studies on cassava fermentation for "fufu" production. *Food Microbiology*, 1985, 5, 125-133.
- [11] OYEWOLE O.B., ODUNFA S.A. - Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. *J. Appl. Bacteriol.*, 1990, 68, 149-157.
- [12] AMPE F., KELEKE S., ROBERT H., BRAUMAN A. - The role of pectin-degrading enzymes during cassava rooting. In: T. ACHEER EGBE, A. BRAUMAN, D. GRIFFON, S. TRECHE (eds.), *Transformation alimentaire de manioc*. Editions ORSTOM, 1995, 251-261.
- [13] MADUAGWU E.N. - Determination of the enzymic and possible content of fermenting cassava and pulp by hydrolytic and microbiological activities. *Toxicology Letters*, 1983, 15, 333-339.
- [14] OKAFOR N., EHOFOR M.A.N. - The microbial breakdown of fufu in fermenting pulp of cassava (*Manduca arizonana* Czantze). *MIRCEN J.*, 1985, 2, 327-338.
- [15] CHURE R.D. - A re-examination of the total cyanide content of cassava (*Manduca arizonana* Czantze). *J. Sci. Food Agric.*, 1978, 29, 345-352.
- [16] BERNARD E. - Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Zenopsis* (ordre phlegmea) entomologique isolée du manioc fermenté. Thèse de Biologie Cellulaire, Microbiologie, Université de Provence, Aix-Marseille I, 1945.
- [17] COLLINS C.H., LYNE P.M. - *Microbiological Methods*, 4th edn., Butterworths (London), 1979.
- [18] HARBEGAN W.F., McCANCE K.E. - *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic Press (London), 1970.
- [19] DUCHANAN R.L., GIBBENS S.E. - *Bailey - Manual of Determinative Bacteriology*, 5th edn. The Williams and Wilkins Co. (Baltimore), 1989.
- [20] OKAFOR N., EHOFOR A.O. - Rapid determination of glucose mask remaining for gari production following fermentation with a yeast, simultaneously producing invertase and amylase. *Proc. Biochem. Int.*, 1990, 6, 82-86.
- [21] OTENG-GYANG K.O., ANOBYE C.O. - Bacteriological studies of the fermentation of manioc (*Manduca arizonana* Poell.) *Acta Biotechnol.*, 1983, 3, 291-292.
- [22] MEBAZ M., SHIRAI K., LARRALDE T., REVAIL S. - Studies on the bacteriological processes of cassava (*Manduca arizonana*). *J. Sci. Food Agric.*, 1973, 60, 457-463.
- [23] GOMBEZ G., VALDIVIESO M., CUESTA DE LA D., KAWANO K. - Cyanide content in whole root chips of tetraploid manioc and its reduction by oven drying or sun drying on trays. *J. Food Technol.*, 1984, 19, 97-102.
- [24] GIBBENS S.E., KIBOMI L., TAYLOR A.J., FOLTIER N.H. - A study in cytoplast content of cassava during storage processing in Cameroon. *Food Chem.*, 1982, 44, 131-136.

- [125] ADDOR-CODE T., MOHME H., SOUBI L., TRÉCHÉ S. - The effectiveness of cyanogen reduction during cassava processing into manioc. In T. AGBOR CODE, A. BRAUMAN, D. GRIFFON, S. TRÉCHÉ (eds.), *Transformation industrielle du manioc*, Editions ORSTOM, 1995, 327-338.
- [126] GODLARD P., LEVET S. - A two-stage fermentation of cassava. *Nature*, 1939, 135, 670-671.
- [127] VASCONCELOS A.T., TWIDDY D.B., WESTBY A., REILLY P.J.A. - Bacteriological cassava during gas preparation. *Intern. J. Food Sci. Technol.*, 1990, 25, 193-203.
- [128] COUPE R.D., BLAKE G.G., BATTERSHILL J.M. - Purification of cassava limoninase. *Phytochemistry*, 1978, 17, 39-383.
- [129] HORVONYAM R.T., ADDOOLA A.A., ORE O.J. - Technical note: the stability of cyanogens. *Food Chem.*, 1980, 17, 221-225.
- [130] BALA NANDISAN, SUNDARESAN S. - Effect of processing on the cyanoglucoside content of cassava. *J. Sci. Food Agric.*, 1955, 16, 1, 97-120.
- [131] DEBEGDE C.O., ONYINE E., CHRISTOPHER O.I., EKEWEGHE O. - Limoninase activity and detoxification of cassava (*Morinda totondina*) during fermentation for tapioca production. *Agric. Biol. Chem.*, 1982, 46, 1657-1659.
- [132] WOOD U. - The isoenzyme properties and enzymic breakdown of limonin from cassava. *J. Sci. Food Agric.*, 1966, 17, 85-90.
- [133] COUPE R.D., BLAKE G.G., BATTERSHILL J.M. - Purification of cassava limoninase. *Phytochemistry*, 1978, 17, 381-383.
- [134] OKAFOR N., HIRFORD M.A.N. - The manufacture of *Lactobacillus mesenteroides*: production, isolation and some properties. *J. Sci. Food Agric.*, 1955, 36, 669-678.
- [135] IKPEDEO C.O., OGUNDU E.C., OROHA A.I. - Limoninase from *Buraxium equiseti*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1987, 25, 327-325.
- [136] ITOH-NASHIDA T., HIRAWA M., IIDA Y. - Purification and properties of 3-D glucosidase (limoninase) from sweet bean, *Phaseolus lunatus*. *J. Biochem.*, 1987, 101, 8-7-83-84.
- [137] YEOW H.H., SIA H.U. - Characterization of limoninase (a beta-glucosidase). *J. Singapore Nat. Acad. Sci.*, 1957, 16, 17-23.
- [138] LEGRAS J.L., KAKKEH M.R., ARNAUD A., GAZZY P. - Purification and properties of 3-D glucosidase from a novel yeast strain possessing *Brachysetomonas* sp. strain R512. *J. Biol. Microbiol.*, 1989, 29, 655-668.
- [139] YEOW H.H. - Kinetic properties of 3-D glucosidase from cassava. *Phytochemistry*, 1989, 28, 721-724.
- [140] STOKK U., LIEBERE R., HARM S.H. - Pattern of enzymes involved in cyanogenesis and HCN metabolism in cell cultures of *Phaseolus lunatus* L. varieties. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1990, 22, 205-212.
- [141] CHAMBE E. - Cyanogenes et cyanures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1953, 31, 423-451.
- [142] MALONGA M., MAVOUNGOU O., KOBAWILA S.C., LOUEMBE D., BRAUMAN A. - Les bactéries lactiques du manioc au cours du séchage. *Caractérisation et évolution*. *Microbiol. - Aliment. Nutr.*, 1991, 11, 471-475.
- [143] MALONGA M., MAVOUNGOU O., KLEKE S., KOBAWILA S.C., LOUEMBE D. - Agents microbiologiques et facteurs impliqués dans le séchage du manioc. *Microbiol. - Aliment. Nutr.*, 1996, 14, 73-81.
- [144] OKOLIE P.N., UGOCHUKWU L.S. - Changes in activities of cell wall degrading enzymes during fermentation of cassava (*Morinda totondina* Curt. ex Willd.) with *Streptococcus* sp. *J. Sci. Food Agric.*, 1988, 44, 5, 61.
- [145] AMPF E., KEI FAE S., ROBERT H., BRAUMAN A. - The role and origin of pectin degrading enzymes during cassava peeling. In T. AGBOR CODE, A. BRAUMAN, D. GRIFFON, S. TRÉCHÉ (eds.), *Transformation industrielle du manioc*, Editions ORSTOM, 1995.
- [146] MKPONG O.E., YAN H., CHISHI G., SAYRE R.F. - Purification, characterization and localization of limoninase in cassava. *Plant Physiol.*, 1990, 93, 176-181.

RESUME

L'étude concerne quatre aliments fermentés traditionnels du Congo : le *nsamba* ou vin de palme produit à partir de la sève du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq), le *poto-poto* ou pâte fermentée de maïs fabriquée à partir de la farine de maïs, le *kikedi* ou tubercule roui de manioc (*Manihot cassava* Crantz) et le *ntoba mbodi* ou feuilles fermentées de manioc. Les fermentations alimentaires spontanées de ces aliments font intervenir une association entre bactéries lactiques, levures et d'autres bactéries dont l'évolution dépend des conditions de l'environnement et du matériel végétal.

Le pH acide (pH 4,2) de la sève du palmier à huile varie très peu au cours de la fermentation et favorise le développement des levures qui deviennent la microflore dominante avec *Saccharomyces cerevisiae* devant les bactéries lactiques dominées par *Lactococcus lactis*. Le *nsamba* résulte d'une fermentation alcoolique et acétique. La production de *kikedi* et de *poto-poto* s'effectue par fermentation lactique. Elle se déroule en milieu acide et en anaérobiose. Le pH et la pression d'oxygène dissous baissent fortement en moins de 24 heures, respectivement de 7 à 3,8 mg/l et de 5,1 à 0,1 mg/l. La microflore lactique est dominante devant la population de levures. Par contre, la production de *ntoba mbodi* s'effectue par une fermentation alcaline. Le pH augmente rapidement de 6,8 à 8,5 et devient basique. Les *Bacillus* constituent la microflore dominante.

L'intérêt des fermentations alimentaires a été mis en exergue avec l'amélioration des propriétés sensorielles des produits par : (1) le changement de structure avec le ramollissement pour le *kikedi* et le *ntoba mbodi*, (2) le changement de couleur avec le brunissement enzymatique pour le *ntoba mbodi* et (3) la détoxification avec l'élimination de l'acide cyanhydrique dans le cas de *kikedi* et de *ntoba mbodi*.

La détoxification des tubercules et feuilles de manioc en fermentations respectivement lactique et alcaline suggère que le mécanisme de l'hydrolyse des glucosides cyanogéniques pourrait faire intervenir la catalyse générale acide-base.