

Caracterisation des proprietes physicochimiques et biochimiques de « *madioko matshukutshuku* » lors de la phase de conservation par immersion

Sanana Munoko John MUYUKU^{1*}, Rachel MPUTU², Ahoka José OKONDA³,
Kalukul Maurice NSIKUNGU⁴, Zola Eric SUMBU⁵ et Mapunzu Kuma Paul MONZAMBE⁶

¹ Université Pédagogique Nationale, Faculté des Sciences Agronomiques, Laboratoire de Chimie & Industries Agroalimentaires, BP 8815 Kinshasa 1, République Démocratique du Congo (RDC)

² Office Congolais de Contrôle, Laboratoire de Microbiologie, Avenue Flambeau, Gombe, BP 8806 Kinshasa, RDC

³ Université Pédagogique Nationale, Faculté des Sciences Agronomiques, Département de Phytotechnie, Unité de recherche en Toxicologie, Laboratoire de Toxicologie Analytique, BP 8815 Kin 1, RDC

⁴ Université Pédagogique Nationale, Faculté des Sciences, Département de Chimie, Unité de recherche Chimie Alimentaire, Laboratoire de Chimie Analytique, BP 8815 Kinshasa 1, RDC

⁵ Université de Kinshasa, Faculté des Sciences Agronomiques, Département de Chimie & Industries Agroalimentaires, Laboratoire de Technologie Alimentaire, BP 117 Kinshasa IX, RDC

⁶ Université Pédagogique Nationale, Faculté des Sciences Agronomiques, Département de Zootechnie, Unité de Recherche Biochimie de la Nutrition, Laboratoire de Bromatologie, BP 8815 Kinshasa 1, RDC

(Reçu le 20 Août ; Accepté le 27 Septembre 2021)

* Correspondance, courriel : muyukusanana@gmail.com

Résumé

Ce travail porte sur la caractérisation des propriétés physicochimiques et biochimiques de « *madioko matshukutshuku* » lors de la phase de conservation par immersion. Les échantillons de cette denrée traditionnelle collectés tel que préparé dans le milieu paysan ainsi que ceux issus de la préparation simulée au laboratoire ont permis d'effectuer les analyses physicochimiques, microbiologiques et biochimiques respectivement par méthodes titrimétriques et par culture microbienne. Les résultats montrent que les eaux puisées des sources et servant des milieux d'immersion constituent la source de la flore microbienne exerçant diverses activités α -amylase et β -glucosidase hydrolysant l'amidon ainsi que les hétérosides cyanogènes (linamarine et lotaustraline) contenus dans le manioc cuit respectivement en sucres fermentescibles et en acide cyanhydrique soluble. Caractérisé par une fermentation hétérolactique, l'acidification du milieu contribue à l'inhibition des coliformes fécaux apportés par les eaux d'immersion. Ainsi, l'immersion du manioc cuit représente une phase de conservation qui offre un « *madioko matshukutshuku* » quasiment décyanuré, protéiné et pouvant être stabilisé pour servir à la lutte contre l'insécurité alimentaire et la malnutrition.

Mots-clés : rouissage, innovation, coliformes, lessivage, détoxifiant et protéinisation.

Abstract

Characterization of the physicochemical and biochemical properties of "*madioko matshukutshuku*" during the immersion conservation phase

This research concerns the characterization of the physicochemical and biochemical properties of "*madioko matshukutshuku*" during the phase of conservation by immersion. The sampling of this traditional food collected as prepared in the original medium as well as the sampling from the simulated preparation in the laboratory made it possible to analyze the physicochemical, microbiological and biochemical aspects respectively by titrimetric methods and by microbial culture. The results obtained show that the water drawn from the sources and having served as immersion media constitutes the source of the microbial germs having exerted various α -amylase and β -glucosidase activities which have hydrolyzed the starch as well as the cyanogenic heterosides (linamarin and lotaustralin) contained in cooked cassava in fermentable sugars and hydrocyanic acid, respectively. Characterized by heterolactic fermentation, the acidification of the medium inhibited fecal coliforms brought in by the immersion water. Thus, the immersion of the cooked cassava represents a preservation phase that provides an almost decyanurized, proteinaceous "*madioko matshukutshuku*" that can be stabilized to be used in the fight against food insecurity and malnutrition.

Keywords : *retting, innovation, coliforms, leaching, detoxifying and proteinization.*

1. Introduction

Pour transformer le manioc, les pratiques traditionnelles africaines courantes font intervenir une combinaison des méthodes comprenant entre autre : l'épluchage, le lavage, le découpage, le trempage, le broyage, le râpage, le séchage, la cuisson et le rouissage [1, 2]. Ce dernier est un procédé fermentaire faisant intervenir une microflore lactique hétérogène des bactéries appartenant aux genres *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* [3, 4]. Les *Aspergillus sp* et *Fusarium sp* sont les genres des champignons exerçant d'importantes activités pectinolytiques et β -glucosidase qui ramollissent la paroi végétale du manioc favorable à l'élimination des composés cyanés [5 - 8]. L'acidification du milieu ainsi que l'anaérobiose qui en résulte sont caractérisées par un pH 4,5 et par une faible pression en oxygène dissout évaluée à 0,8 mg/Litre [9 - 11]. De même, lors de la transformation du manioc en attiéké, les *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecium*, et *Leuconostoc mesenteroides* constituent les germes lactiques acidifiant le milieu de fermentation caractérisé par une forte teneur en humidité évaluée à $47 \pm 7,9$ % [12, 13]. Cependant, tous ces faits physicochimiques et biochimiques évoqués contrastent avec ceux observés lors de la conservation par immersion du manioc cuit dénommé « *madioko matshukutshuku* ». Ce dernier est un aliment de base dans la région de Mayumbe en République Démocratique du Congo. Son processus de préparation fait appel à l'épluchage et au macrodécoupage des racines du manioc, suivi de la cuisson à l'ébullition et de l'immersion à long terme du manioc cuit dans l'eau plusieurs fois renouvelée [14, 15]. Au cours de cette immersion hydrique, une corrélation est constatée simultanément entre la durée de conservation, l'élimination des composés cyanés et l'accroissement du taux protéique. Cela laisse croire que les germes apportés par les eaux d'immersion du manioc cuit exerceraient certaines activités enzymatiques favorisant la décyanuration et l'interconversion des sels azotés en protéines [16]. C'est ainsi qu'il est principalement question dans cet article de (i) faire la sélection, la description et le dénombrement des germes contaminant le solvant d'immersion ; (ii) évaluer certains paramètres physicochimiques et environnementaux, nutritionnels et toxiques ; (iii) déterminer le type d'activités métaboliques responsables de la décyanuration du manioc cuit ; (iv) caractériser les métabolites issus de l'activité fermentaire.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel de laboratoire et appareillage

- Paramètres physicochimiques : utilisation de la verrerie courante, balance de précision, pH - mètre, appareil Kjeldahl, spectrophotomètre, centrifugeuse, agitateur magnétique pour analyse des paramètres physicochimiques ;
- Paramètres microbiologiques et biochimiques : utilisation de bain marie numérique, étuve universelle, incubateur, autoclave électrique, bec bunsen, anse de platine, hotte à flux laminaire et autres.

2-2. Échantillonnage

2-1-1. Prélèvement aléatoire de "madioko matsukutshuku" préparé en milieu traditionnel

De façon aléatoire, des échantillons de « *madioko matshukutshuku* » en conservation sont prélevés quotidiennement durant 16 jours dans quelques ménages du Mayumbe situés entre Boma et Tshela (**Tableau 1**); et cela avant renouvellement du solvant conservateur. Situé à l'Ouest de la R.D.C, la région de Mayumbe s'étend du Nord de Boma vers l'Enclave de Cabinda [17]. Les échantillons ainsi prélevés sont conditionnés dans la glacière et acheminés au laboratoire situé à Kinshasa pour des analyses appropriées.

Tableau 1 : Sites de prélèvement des échantillons de manioc

Sites (villages)	Secteur Territoire	Localisation
Nsanda	Sekebanza	Bifurcation entre la route Inga et la route Tshela
Manterne	Sekebanza	A quelques metres de l'INERA Luki
Kilangu	Lukula	A 56Km de la ville de Boma
Mwengi	Lukula	A 85Km de la ville de Boma
Kangu	Tshela	A 100Km de la ville de Boma
Tshela	Tshela	A 120Km de la ville de Boma

2-1-2. Essai de préparation simulée de "madioko matshukutsuku" mené au laboratoire

Les échantillons de manioc, variétés locales, non altérées provenant des paysans sont lavés, épluchés puis découpés pour des essais de préparation simulée au laboratoire. Des lots de 300 grammes réalisés sont cuits et conservés immergés dans différents solvants (eau de source) avec renouvellement quotidien tel que effectué chez les ménagères qui assurent la préparation traditionnelle de « *madioko matshukutshuku* ». Pour cette expérimentation, la conservation immergée a été effectuée pendant 16 jours.

2-1-3. Essai du rouissage de manioc mené au laboratoire

Trois cents (300) grammes de manioc frais épluché sont immergés pendant 4 jours dans le mélange d'eau de source contenue dans un erlenmeyer de 500 ml. Cet essai témoin du rouissage naturel a servi à l'évaluation de la cinétique de la décyanuration au laboratoire.

2-2. Détermination du rendement technologique de préparation en milieu traditionnel

Au cours du traitement du manioc destiné à la préparation de « *madioko matshukutshuku* », le prélèvement des poids à chaque étape du processus a été effectué dans le but de déterminer le rendement technologique. Ainsi, sur les 300 ménages constituant notre échantillonnage, les données relatives à cette évaluation ont été recueillies auprès de 100 ménages choisis au hasard par alternance des villages et maisons cotoyées.

2-3. Analyses microbiologiques

2-3-1. Milieux et conditions de culture

Les milieux et conditions de culture des germes fermentaires sont décrits ci - dessous : (i) Gélose Bile Esculine Azide (BEA) pour le dénombrement des entérocoques, culture à 37 °C pendant 24-48 heures ; (ii) Milieu Plate Count Agar pour les germes aérobies mésophiles ; culture à 30 et 37 °C pendant 24 à 72 heures. Après homogénéisation et refroidissement, les boîtes de Pétri sont incubées en aérobiose pendant 72 h, à 30 °C ; (iii) Milieu 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 et 37 °C pendant 3 à 5 jours ; (iv) Milieu Man Rogosa Sharpe (MRS) pour le dénombrement et l'isolement des bactéries lactiques ainsi que le milieu Plate Count Agar (PCA) pour le dénombrement et l'isolement des Bacillus après culture microbienne effectuée respectivement à 30°C pendant 24-26 heures pour les bactéries lactiques et à 30°C pendant 24-72 heures pour les bacillus ; (v) Utilisation du milieu M 17 pour la culture des Streptocoques lactiques et Pediocoques ; (vi) Utilisation du milieu Elliker pour la croissance des Lactocoques ; (vii) Utilisation du milieu Hypersaccharose pour la culture des Leuconostocs.

2-3-2. Dénombrement et identification des germes microbiens

Pour les essais microbiologiques, dix grammes de « *madioko matshukutshuku* » sont pesés et broyés à l'homogénéisateur Waring blender. Le broyat est mis en suspension dans 90 ml d'eau peptonée stérile. Des dilutions décimales sont préparées à partir de cette suspension mère pour l'ensemencement des milieux de culture. Les principaux genres et espèces présents sont dénombrés après culture sur milieux sélectifs. Le résultat correspond à la moyenne des nombres de colonies développées (entre 10 et 100 colonies par boîtes). Les critères définis dans le recueil intitulé : "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" sont exploités pour identifier les souches bactériennes. L'identification des champignons est effectuée sur base des propriétés physiologiques, morphologiques et culturelles [18,19].

2-3-3. Activités enzymatiques exercées par les germes microbiens

2-3-3-1. Sélection des micro-organismes à activité amylolytique

La recherche des germes amylolytiques est réalisée sur les souches précédemment isolées [19]. Les *Lactobacillus* productrices d'amylases sont sélectionnées par repiquage des colonies de bacilles gram positif et catalase négative, sur milieu MRS additionné d'amidon soluble à 1 % et d'actidione à 0,025 g/L comme inhibiteur de champignons. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 48 heures. Les levures et moisissures sont sélectionnées sur milieu PDA additionné d'amidon soluble à 1 % et de chloramphénicol à 0,05 g/L, inhibiteur de bactéries. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 72 heures au terme de laquelle une solution de lugol est vaporisée à la surface. Les colonies à halo clair au pourtour sont retenues puis considérées comme productrices d'amylases [20].

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

La recherche des micro-organismes producteurs de linamarase est réalisée par ensemencement des isolats purifiés sur milieu gélosé MRS, ou Sabouraud additionnés de linamarine à 1 % et de picrate alcalin à 0,01 %, comme capteur de cyanures libérés. 10mL de milieu sont introduits dans des tubes à vis de 40 mL. L'ensemble est stérilisé puis refroidi à température ambiante jusqu'à

la prise en masse. Les microorganismes sont alors ensemencés dans la masse par piqûre centrale. Après 48 heures d'incubation à 32°C pour les *Lactobacillus* et 72 heures à 30°C pour les levures et moisissures, les tubes présentant un développement de coloration noire au pourtour de la piqûre centrale sont considérés comme à activité β -glucosidase [20, 21].

2-3-3. Sélection des micro-organismes à activité pectinolytique

La sélection des germes producteurs de pectinases est réalisée en utilisant de la gélose MRS sans glucose et extrait de viande pour les lactobacilles ou du PDA sans glucose pour les levures et moisissures, additionné de 14 g/L de Pectine (74 % de pureté). Le bleu de bromothymol à 0,05 % est utilisé comme indicateur coloré. Les milieux sont stérilisés à 121°C pendant 15mn avant utilisation [20, 21].

2-4. Analyses des paramètres chimiques et environnementaux

Le pH, le taux des Protéines totales, le taux des cyanures totaux, l'acidité titrable, la pression en oxygène dissout, la demande chimique en oxygène (DCO) et la demande biochimique en oxygène (DBO) sont déterminées par des méthodes appropriées [22].

3. Résultats

3-1. Variation des poids des échantillons lors de la préparation et lors de l'immersion

Durant la préparation de « *madioko matshukutshuku* », la variation du poids de la matière première est déterminée à chaque étape du processus selon qu'il s'agit de l'étape de l'épluchage, de la cuisson ou celle de l'immersion du manioc cuit (**Figure 1**).



Figure 1 : Images du poids des échantillons (P_1) du manioc frais, (P_2) des épluchures, (P_3) du manioc cuit et (P_4) du « *madioko matshukutshuku* » après 16 jours d'immersion

Les résultats du test de LSD effectué montrent qu'il y a une différence significative entre les poids des échantillons à chaque étape du processus de préparation. Le test de ppds (LSD) réalisé sur les données relatives aux poids des échantillons recueillies auprès de 100 ménages a donné les résultats présentés ci-dessous au seuil de 5 %.

Poids de madioko ma tshuku tshuku	P_3	P_1	P_4	P_2
<i>Moyennes de traitements</i>	16,583a	15,565b	14,929c	12,805d

Légende : P_1 = Poids en Kilogrammes du manioc frais ; P_2 = Poids du manioc épluché ; P_3 = Poids du manioc cuit et P_4 = Poids du manioc cuit conservé par immersion.

3-2. Nature des germes contaminant le solvant d'immersion

3-2-1. Détection et évolution des germes traduisant la contamination fécale

Les résultats relatifs au test présomptif sur les germes traduisant la contamination d'origine fécale sont présentés dans le **Tableau 2**. Le test de détection effectué sur l'ensemble des échantillons montre que l'eau puisée dans la rivière Nsanda est souillée par la présence des coliformes, notamment : *Escherichia coli*, *Salmonela sp* et *Staphylococcus aureus*. Tous ces germes présents traduisent une contamination fécale de l'eau utilisée comme solvant d'immersion de « *madioko matshukutshuku* ».

Tableau 2 : Contaminants fécaux détectés dans les solvants d'immersion

Microorganismes	Différents milieux d'immersion		
	Eau de source Kangu	Eau de source Kilangu	Eau de rivière Nsanda
Coliformes	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
<i>Salmonela sp</i>	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+

Légende : (+) : Présence, (-) : Absence, UFC : Unité Formant Colonies.

La **Figure 2** ci-dessous montre l'évolution de la diminution de la biomasse de ces contaminants pathogènes à partir du 4^e jour de l'immersion.

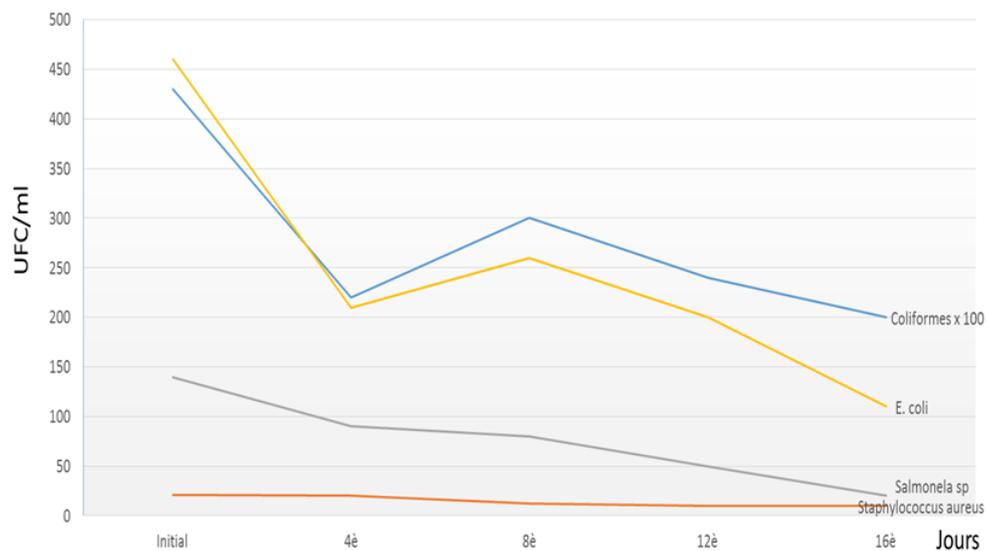


Figure 2 : Évolution de la diminution des germes pathogènes au cours de l'immersion dans l'eau riveraine Nsanda utilisée comme solvant conservateur

3-2-2. Sélection et description des bactéries fermentaires

3-2-2-1. Évolution de la croissance des bactéries au cours de l'immersion

La **Figure 3** indique la prédominance des germes aérobies mésophiles (300 et $13 \cdot 10^6$ UFC/mL du milieu d'immersion), suivi de la flore spécifique représentée par les bactéries lactiques (30 et $12 \cdot 10^6$ UFC/mL). L'accroissement de ces germes est constaté au quatrième jour de l'immersion.

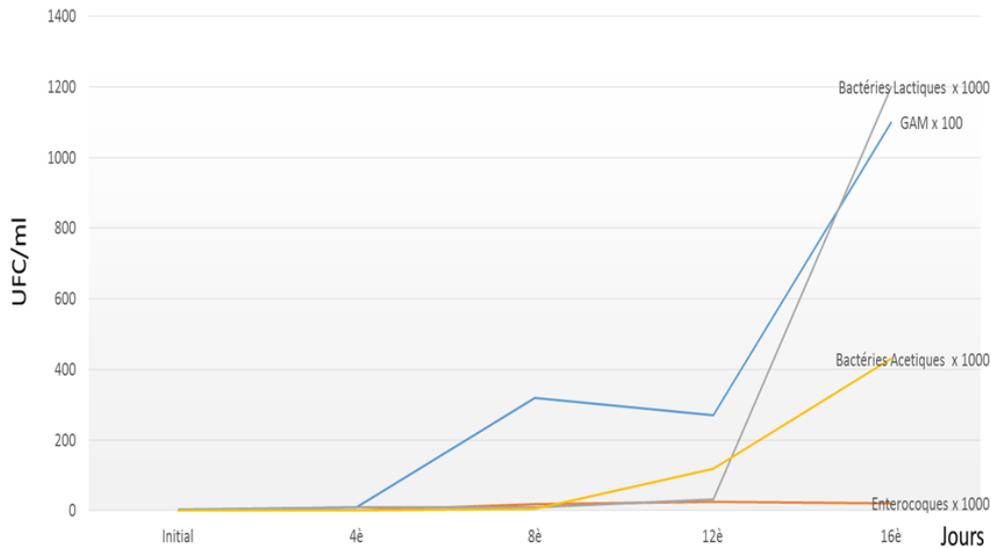


Figure 3 : Évolution des germes fermentaires dans les eaux de source Kangu et Kitanga utilisées comme solvant de conservation

3-2-2-2. Caractérisation et identification des bactéries isolées

La description des caractères morphologiques des bactéries isolées (**Tableau 3**) traduit la présence des lactocoques, pédiocoques, leuconostocs, lactobacilles et des streptocoques.

Tableau 3 : Caractères morphologiques des bactéries isolées

N°	Macro morphologie	Micro morphologie	Genres présumés
1	Colonies blanches, rondes ou lenticulaires	Coccis, diplocoques et en chaîne	Lactocoques
2	Colonies lisses arrondies, grisâtres ou blanchâtres	Coccis en tétrades	Pediocoques
3	Colonies transparentes très petites, rondes	Coccis, ovales, en chaîne	Leuconostocs
4	Petites colonies blanches, rondes ou lenticulaires	Petits bâtonnets en chaînes	Lactobacilles
5	Petites colonies blanches à centre marron et bombées	Bâtonnets longs enroulés, filamenteux, isolés en chaînes	Lactobacilles
6	Colonies blanches, rondes ou lenticulaires	Coccis, diplocoques et en chaîne	Streptocoques

Les tests biochimiques effectués sur les germes isolés ont permis d'identifier les espèces bactériennes suivantes : *Lactobacillus plantarum*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. lactis*, *Lb. amylophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lactococcus diacetylactis*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis*, *Lc. garviae*, *Leuconostoc lactis*, *Ln. amelibiosum*, *Ln. pseudomesenteroides*, *Pediococcus damnosus*, *P. acidilactici* et *Streptococcus thermophilus*.

3-2-3. Sélection et description des champignons

3-2-3-1. Évolution de la croissance des champignons au cours de l'immersion

La **Figure 4** ci-dessous montre la prédominance des levures apportées par les eaux servant de solvant d'immersion durant les seize jours de la conservation.

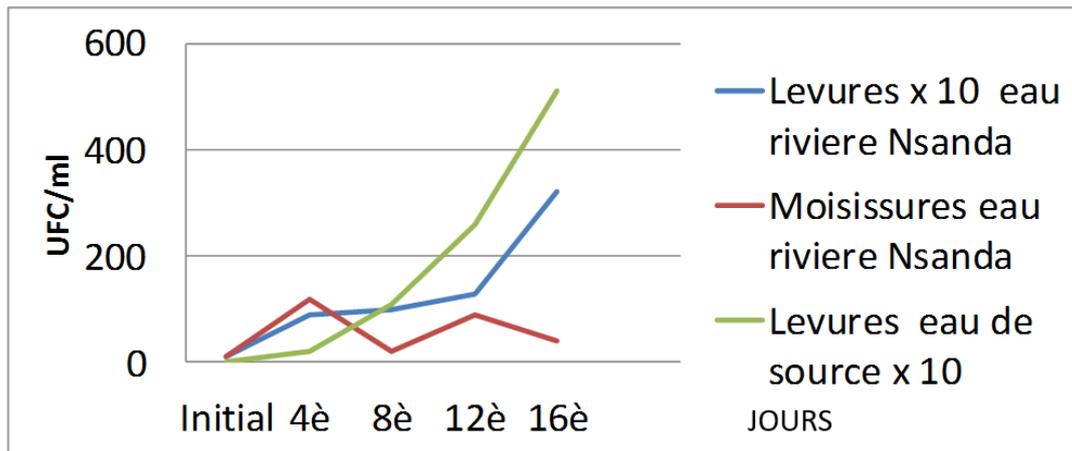


Figure 4 : Évolution des champignons au cours de l'immersion de « madioko matshukutshuku »

3-2-3-2. Caractérisation et identification des champignons isolés

Les caractères morphologiques détaillés dans le **Tableau 4** ci-dessous révèlent la présence des champignons du genre *Saccharomyces*, *Rhizopus* et *Aspergillus*.

Tableau 4 : Caractères morphologiques des champignons isolés

Macro morphologie	Micro morphologie	Genres présumés
Colonies blanches, crémeuses, lisses et brillantes.	Cellules ovoïdes au terme de la coloration au bleu de méthylène. Unicellulaire, luisant,	<i>Saccharomyces</i>
Vésicules fortement pigmentées. Mycélium à croissance rapide, très aérien, blanc – grisâtre.	Filaments ramifiés et bruns, pluricellulaires. Filaments en bouquets portant des stolons. Fructifications avec sporocystes globuleux. Spores allongées et striées.	<i>Rhizopus</i>
Conidiophore en vésicule, velouté, vert-grisâtre. Présence des souches blanches. Tête aspergillaire en colonne longue.	Conidiophore lisse, long, incolore. Vésicule en massue. Phialides en une série, parallèles fixées sur la partie supérieure de la vésicule. Conidies globuleuses, rugueuses à échinulées. Présence de filaments cloisonnés pluricellulaire,	<i>Aspergillus</i>

Les tests biochimiques effectués ont permis d'identifier les espèces des champignons suivants : *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus nigrica*, *R. oryzae* et *Aspergillus fumigatus*.

3-3. Degré d'activités enzymatiques exercées par les microorganismes

Le **Tableau 5** présente le degré d'activités enzymatiques exercées par les différents microorganismes au cours de l'immersion. Les eaux des sources ayant servi du sovant de conservation apportent des germes exerçant diverses activités hydrolysant et détoxifiant. La forte activité β -glucosidase ayant un diamètre auréole estimé à 10mm est exercée par *Lactobacillus fermentum* et *L. lactis*.

Tableau 5 : Degré d'activités enzymatiques exercées par les microorganismes isolés

Microorganismes	Enzymes		
	α -amylase	β -glucosidase	Pectine hydrolase
Espèces des germes bactériens			
<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	+	+
<i>L. fermentum</i>	+	++	++
<i>L. acidophilus</i>	+	-	+
<i>L. lactis</i>	+	++	-
<i>L. amylophilus</i>	±	+	±
<i>L. brevis</i>	-	-	±
Espèces des champignons			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-
<i>Rhizopus nigrica</i>	+	-	-
<i>Rhizopus orizae</i>	++	±	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	+

Légende : ++ : Forte activité (diamètre auréole supérieure à 10 mm); + : Activité moyenne (diamètre auréole comprise entre 5-10 mm); ± : Activité intermédiaire (diamètre auréole comprise entre 1-5 mm); - : Activité nulle.

Quant à l'activité α -amylase, la plus forte ayant un diamètre auréole supérieur à 10 mm est exercée par *Lactobacillus plantarum* pour le compte des bactéries lactiques ainsi que par *Rhizopus orizae* pour les champignons. Bien que la pectine du manioc cuit soit gélifiée pendant la cuisson, une forte activité pectine hydrolase est exercée par *L. fermentum*.

3-4. Variation des quelques paramètres chimiques et environnementaux

3-4-1. Évolution du pH et acidité tirable dans le milieu d'immersion

Au cours de l'immersion, la variation du pH et celle de l'acidité titrable sont effectuées telle que présenter dans la **Figure 5** qui suit. En générale, l'accroissement du taux d'acidité titrable contraste avec la réduction du pH. Le pH enregistré à l'état initial (6 - 6,2) est significativement différent des valeurs du pH à partir du quatrième jour (4,4 - 4,6) jusqu'au seizième jour (3,9 - 4,08) de l'immersion de manioc cuit. De même, le taux d'acidité titrable en début immersion (0,119 - 0,062 mg d'acide lactique pour 10 g de matière) est significativement différent à ceux enregistrés à partir du quatrième jour (5,971-6,019 mg d'acide lactique pour 10 g de matière) jusqu'au seizième jour (11,10-11,95 mg d'acide lactique pour 10 g de matière).

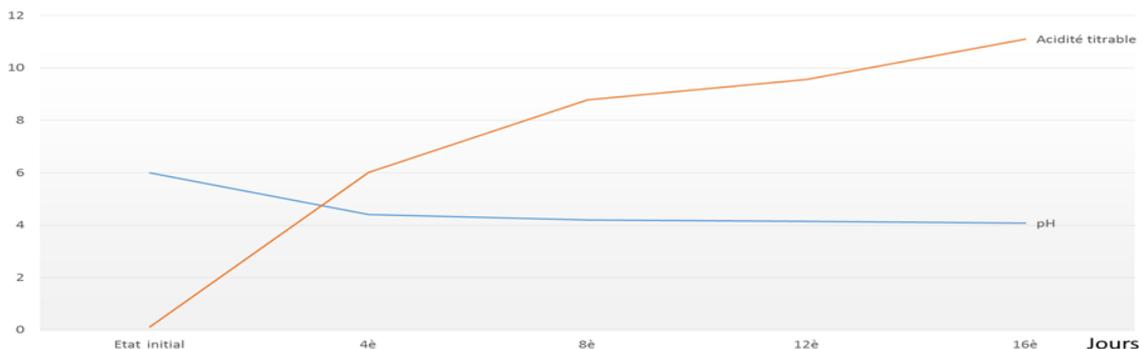


Figure 5 : Évolution des facteurs chimiques au cours l'immersion de manioc cuit

3-4-2. Évolution de quelques paramètres environnementaux

La **Figure 6** ci - dessous présente la variation de la température, la demande biochimique en oxygène (DBO), la demande chimique en oxygène (DCO) et la pression en oxygène dissout.

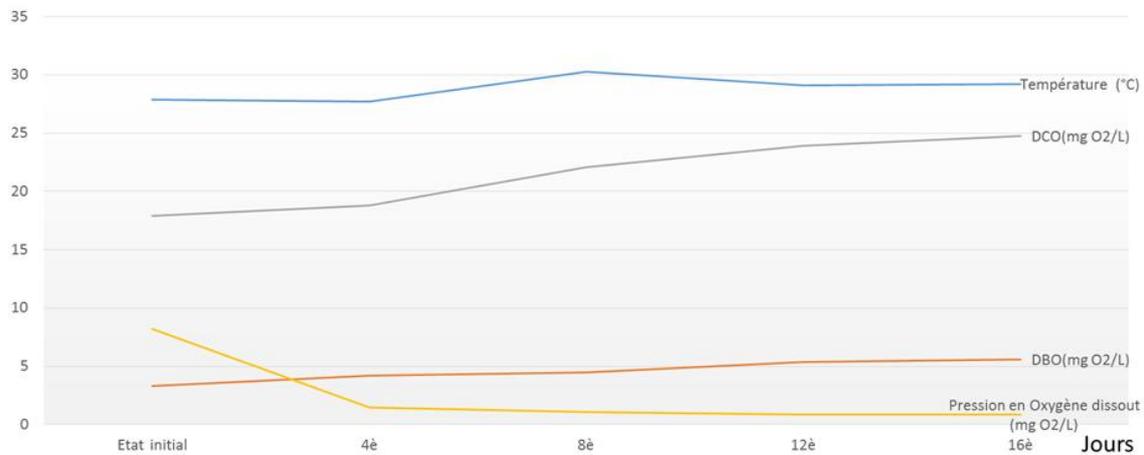


Figure 6 : Évolution des facteurs environnementaux lors de l'immersion de manioc cuit

Cette **Figure 6** montre que la variation de la température (27,3 - 29,2°C), de DBO (3,1 - 5,2 mg d'O₂/Litre) ainsi que celle de la DCO (17,4 - 23,5 mg d'O₂/L) sont restées non significatives dans le milieu d'immersion. Cependant, suite à l'intense activité microbienne, la pression en oxygène dissout à l'état initial (8,2 - 8,5 mg d'O₂/L) est significativement différente de celle enregistrée au seizième jour de l'immersion du manioc cuit « *madioko matshukutshuku* » (0,84 - 0,93 mg d'O₂/L).

3-5. Évolution de quelques paramètres nutritionnels et toxiques

3-5-1. Variation du taux des hydrates de carbone et des protéines brutes

La **Figure 7** présente les résultats sur l'évolution significative du taux d'amidon, des sucres réducteurs et celle du taux en protéines brutes lors de la conservation par immersion du manioc cuit. En général, le taux d'amidon décroît ($73,13 \pm 1,07$ % à l'état initial contre $40,44 \pm 2,95$ % au seizième jour) ; alors que celui des sucres réducteurs augmente sensiblement ($1,23 \pm 0,21$ % au stade initial contre $16,71 \pm 1,5$ % au seizième jour de l'immersion). Une amélioration nette du taux des protéines brutes est enregistrée ($1,06 \pm 0,14$ % P.B à l'état initial comparativement à $2,90 \pm 0,59$ % P.B au seizième jour de l'immersion).

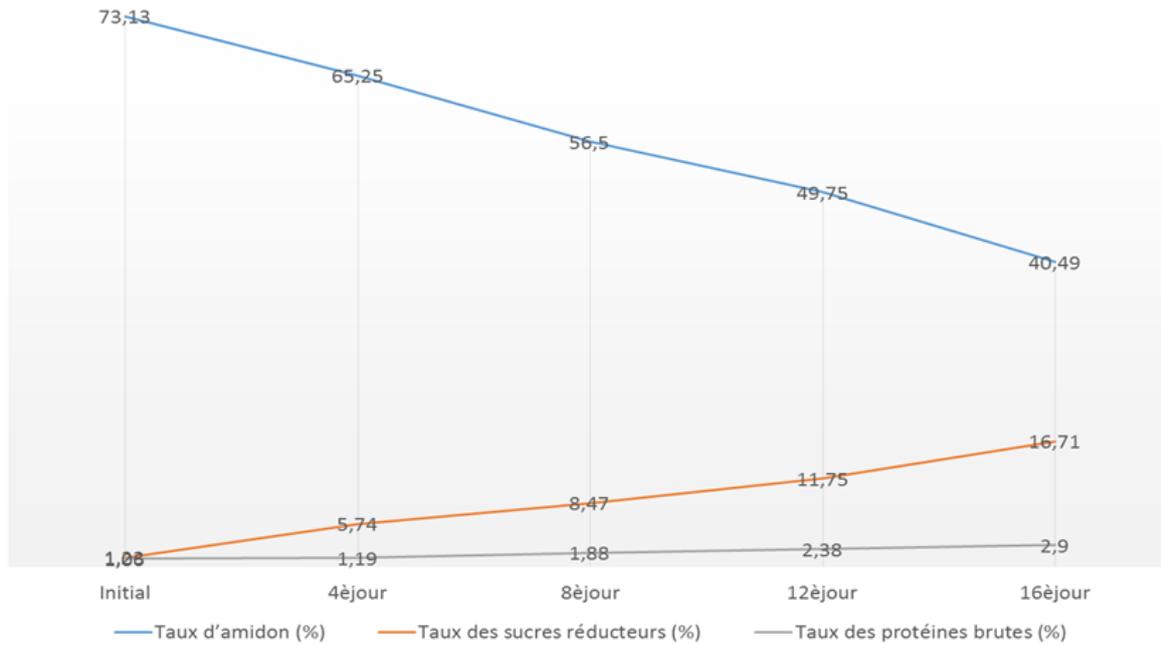


Figure 7 : Évolution des quelques facteurs nutritionnels au cours l'immersion de manioc

3-5-2. Cinétique de l'élimination des cyanures

Pendant l'immersion, l'allure générale de la décyanuration du manioc cuit (*madioko matshukutshuku*) se déroule tel que présenter dans la **Figure 8** qui suit. Ainsi, le taux des cyanures passe de 233,03 ppm au stade initial à 7,7 - 8,9 ppm après 16 jours de conservation immergée ; soit une élimination des composés cyanés évaluée à 97,8 % environ, bien que les enzymes naturellement dans le manioc frais ait été détruits par la chaleur au cours de la cuisson. En comparaison avec l'essai du rouissage effectué, le taux cyanures varie de 233,03 ppm (état initial) à 40 -- 50 ppm (après 4 jours de fermentation).

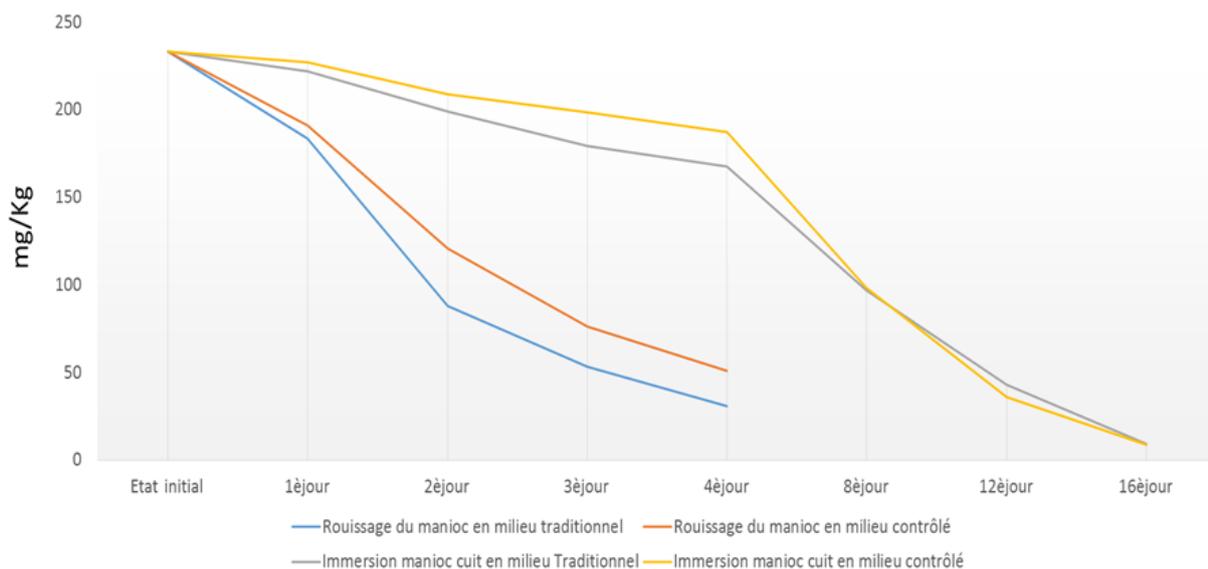


Figure 8 : Cinétique de l'élimination des cyanures au cours de l'immersion du manioc cuit

3-5-3. Caractérisation de quelques métabolites issus de l'activité fermentaire

Au regard des résultats issus de nos essais, la fermentation hétérolactique se déroule durant la conservation par immersion de « *madioko matshukutshuku* ». Cette fermentation est favorisée par les champignons du genre *Saccharomyces* produisant l'alcool éthylique ainsi que par les bactéries lacto-acétiques (*Lactobacillus plantarum*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. lactis*, *Lb. amylophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lactococcus diacetylactis*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis*, *Lc. garviae*, *Leuconostoc lactis*, *Ln. Amelibiosum*, *Ln. Pseudomesenteroïdes*, *Pediococcus damnosus*, *P. acidilactici* et *Streptococcus thermophilus*) contribuant simultanément à la biosynthèse acides lactiques et acétiques responsables de l'acidification du milieu d'immersion.

4. Discussion

4-1. Détection et biomasse des germes traduisant la contamination fécale

Les eaux puisées des sources apportent des contaminants fécaux (*Escherichia coli*, *Salmonella sp* et *Staphylococcus aureus*) dont la biomasse diminue dès le quatrième jour de conservation par immersion de « *madioko matshukutshuku* » ; cela, suite à l'accumulation des acides lactiques et acétiques de le milieu fermentaire. Les investigations effectuées dans le passé confirment que l'introduction massive des lactobacilles lors du rouissage du manioc frais contribue à l'acidification du milieu par la production de l'acide lactique et de l'acide acétique. Ces derniers ont une action stabilisatrice sur la croissance des germes pathogènes, notamment : *Escherichia coli*, *Salmonella sp* et *Staphylococcus aureus* [2, 3, 7, 8, 23, 24].

4-2. Évolution de la croissance microbienne au cours de l'immersion

Au cours de la conservation de « *madioko matshukutshuku* », le milieu d'immersion est prédominé dès le quatrième jour par la biomasse des germes aérobies mésophiles (300 et 13.10^6 UFC/mL) suivi des bactéries lactiques (30 et 12.10^6 UFC/mL) et une biomasse des champignons représentés par *Saccharomyces cerevisiae* (23 - 52.10^2 UFC/mL). En tenant compte de la revue de la littérature, le rouissage du manioc frais est un mécanisme faisant intervenir divers germes microbiens dont la flore lactique prédominante s'accroît les trois premiers jours de la fermentation, puis se stabilise jusqu'à sa fin [4]. Ces résultats vont en droite ligne avec ceux ayant stipulé que les *Lactobacillus sp* représenteraient à partir du 5^e jour de fermentation de gari 25 % des flores totales aérobies [5]. En comparaison la préparation d'attiéké, le milieu fermentaire est prédominé par, les bactéries lactiques ($5,7 10^7$ UFC/g), les levures ($5,5 10^7$ UC/g) ainsi que les Bacillus ($3,8 10^7$ UFC/g) [12].

4-3. Degré d'activités enzymatiques exercées par les microorganismes

Durant la conservation par immersion de « *madioko matshukutshuku* », les *Lactobacillus fermentum* ainsi que *L. lactis* exercent une forte activité β -glucosidase ayant favorable à l'hydrolyse des composés cyanés en acide cyanhydrique soluble. Simultanément, Quant à l'activité α -amylolytique, elle est exercée simultanément par *Lactobacillus plantarum* (bactéries lactiques) et par *Rhizopus orizae* (moisissures) exercent une forte activité α -amylolytique hydrolysant l'amidon du manioc cuit en sucres fermentescibles. Il est également à signaler une forte activité pectine hydrolase exercée par *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *Rhizopus orizae* et *Aspergillus fumigatus* ; bien que l'amidon de ce manioc ait été gélifié au cours de la cuisson. Ces résultats sont en phase avec ceux stipulant que le *Lactobacillus plantarum* et le *Rhizopus oryzae* sont des meilleures souches productrices de l' α -amylase et de β -glucosidase au cours de la fermentation de l'attièke [10, 12].

4-4. Évolution du degré d'acidité et de la pression en oxygène dissout

Comparativement à l'état initial (pH 6 - 6,2), le pH du manioc cuit en conservation varie de manière significative jusqu'à pH 3,9 - 4,08 au seizième jour de l'immersion. Ces résultats corroborent ceux ayant démontré qu'au cours du rouissage du manioc frais, le pH passe de $6,9 \pm 1,2$ à $5,9 \pm 1,7$ dès la 12^{ème} heure pour se stabiliser autour de $3,1 \pm 1,5$ après 72 heures de fermentation [11]. Il en est de même pour l'acidité titrable dont le taux augmente significativement de 0,119 - 0,062 mg d'acide lactique pour 10 gr d'échantillon en début immersion à 11,10 - 11,95 mg d'acide lactique pour 10 g d'échantillon au seizième jour de conservation immergée. Cela se confirme avec les travaux antérieurs stipulant qu'au cours du rouissage de manioc frais, le taux d'acidité titrable s'accroît exponentiellement de 0,0091 - 0,088 à 6,63 - 9,29 mg d'acide lactique pour 10 g de manioc en 72 heures [4, 5]. Par ailleurs, à l'état initial les solvants conservateurs sont saturés en oxygène dissout (8,2 - 8,5 mg d'O₂/Litre) ; pression significativement différente de celle enregistrée au seizième jour de l'immersion de « *madioko matshukutshuku* » sous eaux (0,84 - 0,93 mg d'O₂/Litre). L'activité microbienne contribue à la diminution de la pression en oxygène dissout dans un milieu expérimental marin. Pendant qu'une eau très aérée est généralement sursaturée en oxygène, celle chargée en matières organiques dégradables par des microbes est sous saturée en oxygène dissout [25, 26].

4-5. Variation de certains principes nutritionnels et toxiques

Le taux d'amidon contenu dans le « *madioko matshukutshuku* » décroît significativement de $73,13 \pm 1,07$ % au stade initial jusqu'à $40,44 \pm 2,95$ % au seizième jour de conservation. Cela contraste avec l'accroissement exponentiel du taux des sucres réducteurs de $1,23 \pm 0,21$ % (en début immersion) à $16,71 \pm 1,5$ % (au seizième jour de l'immersion). Ces résultats confirment ceux ayant montré qu'au cours du rouissage du manioc frais, les enzymes amylolytiques hydrolysent la chaîne d'amidon pour disponibiliser un taux élevé des sucres réducteurs. Ces derniers sont dégradés en acide lactique acidifiant le milieu de fermentation [4, 13, 27]. Concernant l'évolution du taux des protéines brutes, il varie significativement de $1,06 \pm 0,14$ % au stade initial à pour atteindre $2,90 \pm 0,59$ % au seizième jour de la conservation par immersion. Au cours du rouissage du manioc, l'inoculation d'un starter mixte constitué de trois souches microbiennes (*Lactobacillus sp.*, *Saccharomyces sp.*, et *Rhizopus sp.*) a permis d'augmenter la teneur en protéines jusqu'à 10 ± 2 % P.B/M.S [28]. Cet accroissement du taux protéique se justifie par le fait que les levures et les moisissures par leurs corps protéiques constituent une source en protéines de qualité [6, 29]. Sur le plan toxicité, environ 97,8 % des composés cyanés contenus dans le « *madioko matshukutshuku* » sont éliminés durant la phase d'immersion. C'est ainsi que la concentration en cyanures passe de 233,03 ppm (stade initial) à 7,7 - 8,9 ppm (au seizième jour de conservation sous eaux). Ces résultats vont en droite ligne avec les normes contenues dans le CODEX ALIMENTARUS stipulant que "la farine de manioc comestible est un produit alimentaire dont le niveau total de l'acide cyanhydrique ne doit pas excéder 10 mg/kg" [30]. Contrairement aux résultats enregistrés au cours du rouissage du manioc frais, la concentration en cyanures passe de 170 ± 36 ppm le premier jour pour se stabiliser à 100 ± 11 ppm après 84 heures de fermentation ; soit une réduction de 41% des composés cyanés [31]. Les expositions alimentaires aiguës pour l'acide cyanhydrique total vont jusqu'à un maximum de 100 µg/kg de poids corporel par jour pour les enfants et de 25 µg/kg de poids corporel par jour pour les adultes [32].

4-6. Caractérisation des métabolites issus de l'activité fermentaire

La fermentation hétérolactique caractérise la phase de conservation par immersion de « *madioko matshukutshuku* ». L'isolement des germes microbiens a permis l'identification des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, ainsi que la

présence des champignons du genre *Saccharomyces*, *Rhizopus* et *Aspergillus* responsables de l'acidification du milieu (acides lactique et acétique) et de la production de l'éthanol respectivement. De même, le rouissage du manioc est une fermentation hétérolactique faisant intervenir une microflore complexe comprenant les bactéries lactiques et champignons du genre *Saccharomyces sp*, *Rhizopus spp*, *Clostridies spp*. et probablement les *Bacillus spp* ou *Klebsiella spp*. [4, 33, 34]. Les bactéries lactiques et acétiques associées aux champignons du genre *Saccharomyces* qui s'y trouvent contribuent à la biosynthèse de l'éthanol, des acides lactiques et acétiques [1, 10, 25].

5. Conclusion

La fermentation hétérolactique caractérise la phase de conservation immergée de « *madioko ma tshukutshuku* » prédominée par les germes aérobies mésophiles apportés par les eaux d'immersion généralement souillées des coliformes fécaux. Ces derniers sont inhibés par les acides lactiques et acétiques secretés au cours du mécanisme fermentaire. Les conditions physicochimiques du milieu favorisent aux *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. lactis* et le *Rhizopus orizae* d'exercer diverses activités enzymatiques de types α -amylase et β -glucosidase hydrolysant respectivement l'amidon du manioc cuit en sucres réducteurs et détoxifiant quasiment ce manioc cuit en composés cyanés. Il en résulte également une amélioration de la teneur en protéines imputable à l'activité métabolique des champignons de par leur corps protéique. Ce mécanisme complexe de décyanuration du manioc cuit diffère de celui du rouissage de manioc frais par la durée élargie du processus d'immersion impliquant à la fois le lessivage et l'activité des exo-enzymes. Il importe d'améliorer le procédé de préparation et de décyanuration de cette denrée traditionnelle du Mayumbe.

Remerciements

Les auteurs adressent leurs sincères remerciements au Projet de Recherche pour l'Innovation Agricole (PRIA) sponsorisé par le Gouvernement de la R.D. Congo pour le financement de cette recherche par l'ACCORD DE SOUS-TRAITANCE du 05/01/2016 entre Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA) et Université Pédagogique Nationale/Faculté des Sciences Agronomiques (UPN/FSA).

Références

- [1] - A. C. KAKOU, "Optimisation des conditions d'application d'une méthode de conservation longue durée de la pâte de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) en vue d'améliorer la qualité alimentaire de l'Attiéké". *Thèse de 3ème cycle* en Biochimie-Microbiologie, Université de Cocody (Côte d'Ivoire), Limited., (2000)
- [2] - E. ASSIEDU, A. KONE, J. KOUAME et T. ODILE, "Transformation du manioc en gari et en farine panifiable de haute qualité en Afrique de l'Ouest", CORAF/Wecard, USAID, Sanghai, Limited, inédit, (2011)
- [3] - P. B. AGBOBATINKPO, J. BALIMBI, L. ADINSI, P. AZOKPOTA & D. J. HOUNHOUIGAN, Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin (BRAB). Numéro Spécial Interdisciplinaire, Septembre (2019)
- [4] - P. M. T. AKELY, N. G. AMANI, O. AZOUMA et C. NINDJIN, In Amani G., Nindjin C., N'Zué B., Tschannen A., et Aka D. (eds), *Potentialités à la transformation du manioc (Manihot esculenta Crantz) en Afrique de l'Ouest*. Actes de l'atelier international UAA-CSRS-CNRA-I2T, Abidjan, CSRS, (4-7 juin 2007) 153 - 157 p.

- [5] - A. C. KOUAKOU, F. N. KOUADIO, A. T. DADIE, D. MONTET & M. K. DJÈ, *Cahiers Agricultures*, 22 (2013) 559 - 67
- [6] - D. L. YANDJU, "Importance des moisissures dans le ramollissement du manioc en fermentation sèche". Fac.Sc. UNIKIS, Kisangani, Zaïre, (1989) 200 p.
- [7] - E. GIRAUD, A. BRAUMAN et M. RAIMBAULT, In : Transformation alimentaire du manioc, Agbor, Brauman et al. Ed. Doc. Orstom Colloques et Séminaires, Paris, (1995) 353 - 365
- [8] - A. BRAUMAN, S. KELEKE, O. MAVOUNGOU, F. AMPE et E. MIAMBI, In Agbor (E.), Brauman (A.), Griffon (D.), Trèche (S.) éd.: Transformation Alimentaire du Manioc. Orstom, Paris, (1995) 35 - 46
- [9] - S. KELEKE, "Le rouissage du manioc : contribution à l'étude du phénomène de ramollissement des racines de manioc". Thèse, Université Paris XIII France, Val de Marne, (1996) 160 p.
- [10] - D. R. DJOULDE, N. J. J. ESSIA & F. X. ETOA, *Biosciences Proceeding*, Vol. 7, (2000) 126 - 134 p.
- [11] - S. C. KPENAVOUN, F. OKRY, F. SANTOS & D. J. HOUNHOUIGAN, Techniques de production et de transformation de manioc au Bénin. Annales des sciences agronomiques, 22 (1) (2018) 93 - 110, ISSN 1659 - 5009
- [12] - N. T. DJENI, "Typologie de l'*attiéké* de trois zones de production de Côte d'Ivoire et analyse des propriétés des levains traditionnels utilisés pour sa préparation". Thèse unique de Doctorat, Université d'Abobo-Adjamé, (2009) 170 p.
- [13] - E. R. KRABI, A. A. ASSAMOI, D. BRÉHIMA, L. S. NIAMKÉ et P. THONART, *European Scientific Journal*, édition, Vol. 11, N°15 (2015) ISSN: 1857 - 7881 - ISSN 1857 - 7431
- [14] - P. MALUMBA, "Les procédés artisanaux et les perspectives de développement de l'industrie de transformation des racines tubéreuses du manioc", in Réseau African Cassava Mosaic Disease, (November 2009)
- [15] - S. M. J. MUYUKU, R. MPUTU, A. J. OKONDA, K. M. NSIKUNGU, Z. E. SUMBU et K. M. P. MONZAMBE, *Afrique SCIENCE*, 17 (6) (2020) 76 - 90, <http://www.afriquescience.net>
- [16] - S. M. J. MUYUKU, Z. E. SUMBU, K. M. NSIKUNGU, K. M. P. MONZAMBE, A. J. OKONDA et I. NKUMU, *Afrique SCIENCE*, 17 (3) (2020) 168 - 175, <http://www.afriquescience.net>
- [17] - R. BARNES, "Conservation et utilisation rationnelle des écosystèmes forestiers en Afrique centrale, Profile of the Zaïre Forest", IUCN International Report, Limited, (1998)
- [18] - O. KANDLER & N. WEISS, In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology., édés Williams & Wilkins, Baltimore, Vol. 2, (1986) 1208 - 1234
- [19] - G. KLEIN, *International J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51 (2001) 259 - 261
- [20] - F. BISSONNETTE, S. LABRIE, H. DEVEAU, M. LAMOUREUX et S. MOINEAU, *Journal Dairy Sci.*, Vol. 83, N° 4 (2000) 620 - 627 p.
- [21] - G. M. KEMPLER & L. L. MCKAY, *Journal Appl. Environ. Microbiol.*, 39 (1980) 946 - 957
- [22] - D. COZZOLINO, W. CYNKAR, N. SHAH & P. SMITH, "Quantitative analysis of minerals and electric conductivity of red grape homogenates by near infrared reflectance spectroscopy. Computers and electronics in agriculture", 77 (1) (2011) 81 - 85
- [23] - M. KOSTINEK, A. HANAK, I. SPECH, C. M. DORTU, P. THONART, S. MBUGUA, C. HERTEL & C. M. FRANZ, *International Journal of Food Microbiology*, 128 (2008) 258 - 267
- [24] - M. LYDIA, "Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Lignes directrices pour l'interprétation", Service de la sécurité alimentaire/Direction de santé, F-054 Rev03, L-2361 Strassen, Luxembourg, (2015) 59 p.
- [25] - O. LOKONGA, K. KWEMB and N. OSENGE, *International Journal of Innovation and Scientific Research*, ISSN 2351-8014, Vol. 48, N° 2 (May 2020) 70 - 87 p.
- [26] - A. A. YAO, M. EGOUNLETY, L. P. KOUAME et P. THONART, Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amyliacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest : leur utilisation actuelle, Limited, (2009)

- [27] - F. A. TETCHI, O. W. SOLOMEN, K. A. CÉLAH & N. G. AMANI, *Innovative R. food biotechnology*, 10 (2012) 40 - 47
- [28] - D. R. DJOULDE, N. J. J. ESSIA et F. X. ETOA, *International Journal of Innovation and Scientific Research*, ISSN 2351-8014, Vol. 14, N° 2 (2015) 268 - 277
- [29] - S. H. KOUHOUNDÉ, K. ADÉO, F. DELVIGNE, A. S. TRAORE & P. THONART, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4 (3) (2014) 277 - 281
- [30] - FAO et OMS, "Codex standard for sweet cassava. Codex Alimentarius", (2008) Accessed at: <http://www.codexalimentarius.org/>, consulté à Kinshasa le 29 Avril 2019
- [31] - P. M. T. AKELY, Y. A. OUÉZOU & G. A. N'GUESSAN, *Journal of Food Engineering*, 101 (2010) 343 - 48
- [32] - FAO-OMS, "Avant-projet de limites maximales pour l'acide cyanhydrique dans le manioc et les produits à base de manioc". Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, comité du codex sur les contaminants dans les aliments, Septième session, Moscou, Fédération de Russie, 8 - 12 avril 2013, Commission du Codex Alimentarius, (2013) CX/CF 13/7/10
- [33] - G. N. ASSANVO, Y. E. N. BEHI et Z. FARAH, *Bioterre, revue internationale sciences de la vie et de la terre*, N° spécial, (2002) 14 p.
- [34] - R. D. DARMAN, F. X. ETOA, J. J. E. NGANG & C. M. F. MBOFUNG, *Tropicultura*, 23 (1) (2005) 11 - 18