TP
92
399

SR925574
DK 335063

711

CIRAD
Avenue du val de Montferrand
34 Montpellier

STAGE AU LABORATOIRE

"ANALYSES ORGANIQUES ET BIOCHIMIQUES"

Dosages des composés cyanogénétiques et du cyanure dans le manioc

Juillet-Aout 1986

CIRAD
000074845

PB

Valérie CESBRON

42101

REMERCIEMENTS

J'adresse mes très sincères remerciements à M J.C. DUMAS,Chef du laboratoire d'Analyses Organiques et Biochimiques ,ainsi qu'à M. G. CHUZEL,responsable du programme "transformation du manioc en gari" au CEEMAT pour m'avoir permis d'effectuer ce stage.

J'exprime toute ma reconnaissace au personnel deu laboratoire AOB por leur accueil ,leurs conseils et le temps qu'ils m'ont consacré pendant ce stage.

SOMMAIRE

INTRODUCTION p 1

1 CONTEXTE GENERAL p 2

1.1 Le CIRAD p 2
1.2 L'AOB

2 LA TRANSFORMATION DU MANIOC EN GARI p 4

2.1 Procédé traditonnel p 4
2.2 Le programme CEEMAT p 6
2.3 Toxicité du manioc p 6
2.4 Mécanismes de détoxification p 8

3 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE:METHODES DE DOSAGE p 10

3.1 Principe général des différentes méthodes de dosage p 10
3.2 Méthodes de dosage des ions cyanures p 10
3.3 Méthodes de dosage des composés cyanogénétiques p 11
3.4 Evolution des méthodes p 12

4 METHODES ANALYTIQUES RETENUES p 15

4.1 Méthode électrochimique:ionométrie p 15
4.2 Méthode colorimétrique p 16
4.3 Conclusion p 22

5 DOSAGES REALISES : RESULTATS p 23

BIBLIOGRAPHIE p 25

INTRODUCTION

Le Manioc est une culture de subsistance typique des pays en voie de développement.La technologie alimentaire reste une technologie artisanale mais permet toutefois de maintenir une activité socio-économique importante dans les zones rurales où le manioc est produit.Le CEEMAT,en collaboration avec l'INPT (Institut National des Plantes à Tubercules) au Togo a établi un programme sur la mécanisation de la transformation du manioc en gari.La mise au point du dispositif mécanique du procédé a été réalisé en France,dans les ateliers du CEEMAT à Montpellier;l'expérimentation en site réel est en cours au Togo actuellement.

Le procédé mis en œuvre a trois objectifs principaux:

+transformer la matière première en un produit stable de longue conservation,

+élaborer un produit final ayant les mêmes qualités organoleptiques et le même aspect que le produit traditionnel,

+obtenir des taux résiduels de cyanure dans le gari présentant le moindre risque.

C'est ce troisième point qui fait actuellement l'objet d'une étude consistant à:

+doser les composés cyanogénétiques dans le manioc et durant le processus de transformation,

+étuder les différents mécanismes de détoxification,

+étudier l'influence des différents traitements technologiques effectués dans la ligne de transformation sur les teneurs en composés cyanogénétiques.

Or,ceci n'est possible qu'avec une méthode de dosage fiable et très reproductible.C'est ainsi qu'est née la collaboration CEEMAT et AOB pour la mise au point d'une méthode analytique de dosage des composés cyanogénétiques facilement appliquable en site réel.C'est au sein de cette association que ce stage s'est déroulé sur les thèmes suivants:

+mise au point d'une technique analytique pour le dosage des cyanures ,

+dosage des composés cyanogénétiques du manioc au cours de sa transformation en gari.

Ce stage,dans un contexte plus général, a également permis une appproche plus vaste des différentes techniques utilisées en biochimie alimentaire.

1 CONTEXTE GENERAL

1.1 LE CIRAD

Le CIRAD est un Etablissement Public à Caractère Industriel et commercial qui regroupe dans un même organisme onze départements et secteurs de recherche.Il s'est organisé autour de l'ancienne structure par "Instituts" avec:

-des départements par filière produit:IRCC(Café-cacao),IRAT (Cultures vivrières),IRFA (Fruits et agrumes)...

-des départements ayant une approche plus "horizontale",c'est-à-dire sans se limiter à une filière produit:DSA(Systèmes agraires),CEEMAT (Machinisme agricole,technologie alimentaire) .

A côté de ces départements,existent les Laboratoires de Services Communs dont les laboratoires d'Analyses Organiques et Biochimiques (AOB),Analyses Minérales des Plantes (AMP)...

Le CIRAD est l'un des principaux outils de la coopération française en recherche-développement dans les Pays en Voie de Développement.

Le principal centre métropolitain se trouve à Montpellier avec quelques 350 employés et 58 laboratoires.Le CIRAD est également implanté dans l'ensemble des régions chaudes,soit par des centres propres à chaque département,soit associé à des organismes locaux en assurant une assistance scientifique et technique.

Les types d'intervention s'articulent autour des trois missions principales suivantes:

-Recherche,

-Formation,

-Développement.

1.2 LE LABORATOIRE ANALYSES ORGANIQUES ET BIOCHIMIQUES

Le laboratoire AOB est un laboratoire commun d'analyses,utilisé par les différents départements du CIRAD.Les domaines d'intervention de l'AOB sont:

-l'analyse,

-la méthodologie et la recherche,

-la formation.

L'équipement varié du laboratoire en moyens analytiques permet de faire des analyses dans des domaines divers;ainsi,peux-t-on citer:

-Analyseur d'acides aminés DURRUM D500

Il permet de faire des contrôles de qualité protéïque,en étudiant par exemple l'évolution des acides aminés dans un matériel végetal qui a subit des traitements technologiques spéciaux;cette technique intervient également dans le cadre d'utilisation des acides aminés libres en tant que marqueur biochimique.

-Chaine HPLC BECKMANN

Cette chaîne est destinée à l'analyse des acides organiques,des sucres,des vitamines et des acides aminés.

-Auto-analyseur TECHNICON

Cette technique,basée sur des réactions colorimétriques,permet d'effectuer des dosages de différents composés organiques tels que l'amidon,les sucres solubles...,de mesurer l'activité d'enzymes...

-Spectrophotomètre de masse VARIAN

Il est utilisé pour la détermination d'excès isotopique d'azote 15.

Les principales missions dans les domaines de l'analyse et de la méthodologie consistent en:

- une détermination de constituants organiques,
- une mise au point de méthodes analytiques pour les départements du CIRAD qui n'ont pas de matériels adaptés,
- des travaux effectués à la demande d'organismes extérieurs.

En conclusion, l'AOB est à la fois un laboratoire de service ayant une expérience étendue sur un grand nombre de techniques et un partenaire dans des programmes édifiés par les différents départements du CIRAD ou d'autres organismes. Voici quelques exemples de collaboration:

- IRAT: "Influence de la teneur en arginine sur les boutures de canne à sucre "in vitro" (1984)
- SIARC: "Ajout de grains crûs au cours du brassage du sorgho" (1984)
- CEEMAT: Cette collaboration a été établie à deux reprises:

+ "Recherches d'alternatives technologiques pour l'hydrolyse enzymatique de l'amidon de manioc" (1982); le but etait de proposer des solutions originales d'hydrolyse en ayant recours aux matières premières locales, différentes sources enzymatiques ayant été envisagées.

+ "Dosage des composés cyanogénétiques" (1985...); il s'agit surtout d'une mise au point de méthodes analytiques à partir de celles déjà connues, alliant la facilité de mise en œuvre, l'exactitude et la reproductibilité.

Dans les deux cas, l'AOB a été utilisé comme appui analytique en apportant le matériel et l'expérience appropriés et comme laboratoire d'accueil pour des manipulations.

2 LA TRANSFORMATION DU MANIOC EN GARI

Le manioc est une plante tropicale,semi-arbustive,à cycle pluri-annuel,dont les racines peuvent être destinées à l'alimentation animale ou humaine.

Actuellement,le manioc dont la production annuelle est de l'ordre de 115 millions de tonnes et dont 90% sont réservés à l'alimentation humaine,est l'aliment de base pour près de 200 à 300 millions de personnes.

Néanmoins,le manioc présente la double particularité suivante:
-d'être un produit hautement périssable,dès sa récolte,ce qui nécessite un traitement technologique dans les 48 heures ,
-de présenter un certain degré de toxicité due à la présence de composés cyanogénétiques.Ceux-ci se décomposent en cyanures,à l'origine de très graves risques d'intoxification.

Les populations autochtones ont su très tôt développer toute une série de technologies permettant de stabiliser le produit et de diminuer les teneurs en cyanures.Les techniques traditionelles qui utilisent seules ou asssociées des étapes comme le rouissage,la fermentation,le broyage,l'ébullition,le séchage..,sont nombreuses et variées.

Parmi ces techniques,certaines connaissent une diffusion importante comme la fabrication du gari en Afrique del'Ouest.

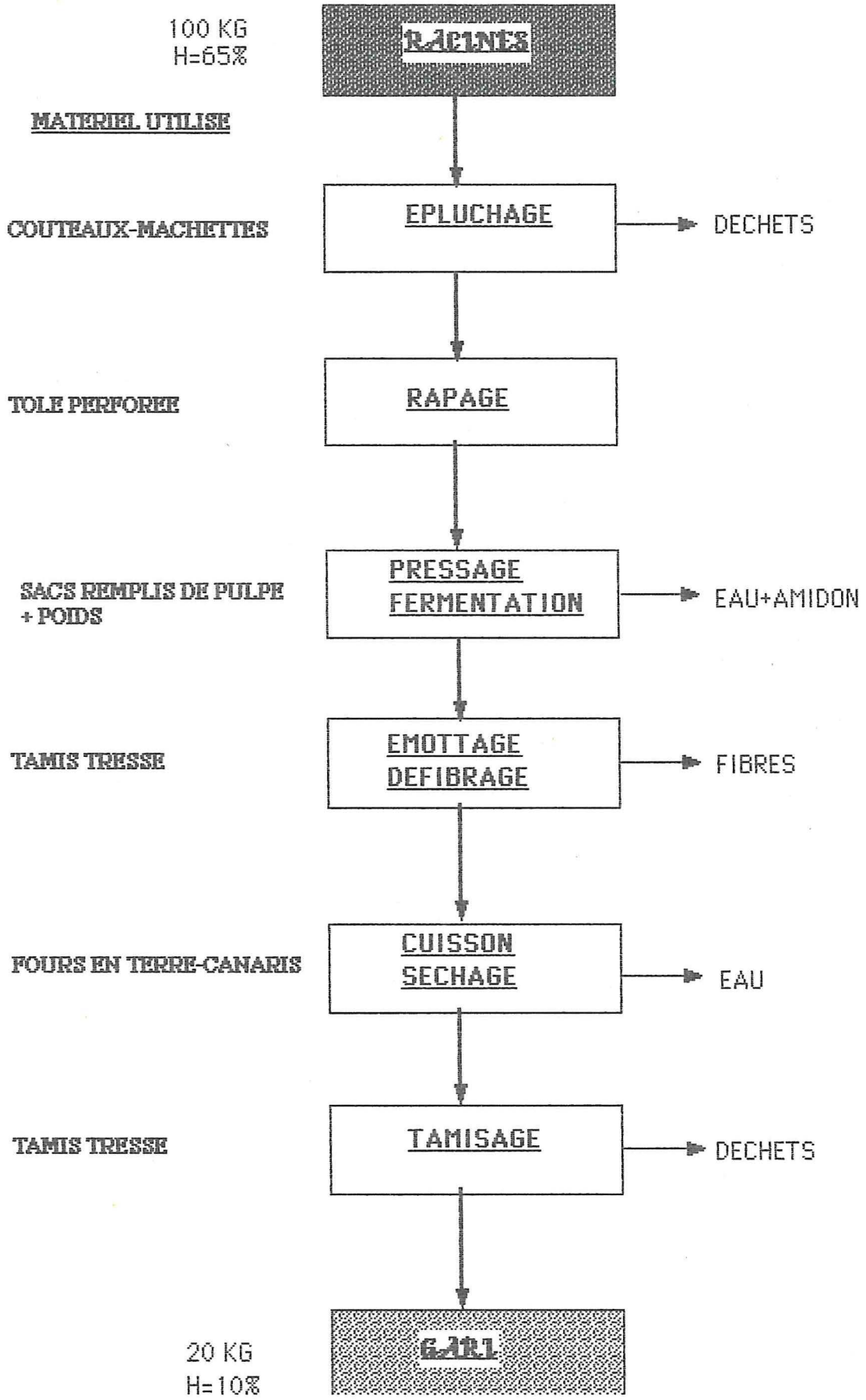
Le GARI est un produit sec,constitué d'une sorte de semoule, consomné comme aliment de base dans de nombreux plats africains(importante source de calories).La transformation du manioc en gari est actuellement effectuée de manière traditionnelle dans toute l'Afrique de l'Ouest.Le programme développé par le CEEMAT consiste à mécaniser ces techniques tout à fait sommaires.

2.1 LE PROCEDE TRADITIONNEL

Les differentes étapes rencontrées dans le procédé traditionnel sont présentées dans le flow-sheet donné ci-après.

Toutes ces étapes,relevant exclusivement du secteur féminin,sont simples et ne nécessitent aucun matériel élaboré ni énergie particulière...Cependant,ces techniques
-demandent un effort très pénible,
-posent des problèmes de quantité et de qualité du produit final,
-ne peuvent se développer en l'état au stade artisanal ou semi-industriel.

Même si la production par les structures informelles permet l'approvisionnement des villes et grosses bourgades,il est absolument nécessaire de:
-valoriser le savoir-faire traditionnel,
-développer l'artisanat agro-alimentaire,
-favoriser une activité économique en zones rurales,
-faciliter le travail des femmes.


100 KG
H=65%
RACINES
MATERIEL UTILISE
COUTEAUX-MACHETTES
EPLUCHAGE
DECHETS
TOLE PERFOREE
RAPAGE
SACS REMPLIS DE PULPE
+ POIDS
PRESSAGE
FERMENTATION
EAU+AMIDON
TAMIS TRESSE
EMOTTAGE
DEFIBRAGE
FIBRES
FOURS EN TERRE-CANARIS
CUISSON
SECHAGE
EAU
TAMIS TRESSE
TAMISAGE
DECHETS
20 KG
H=10%
GARI

2.2 LE PROGRAMME CEEMAT

Le projet consiste à proposer une ligne de transformation modulaire du manioc en gari,alliant technologies nouvelles,innovations et savoir-faire traditionnel,c'est-à-dire à mécaniser la production de gari grâce à la mise au point d'un procédé par équipements modulaires,pouvant fonctionner en continu,et permettant d'obtenir un produit final identique au produit traditionnel.

ce programme doit permettre de:
-valoriser le savoir-faire traditionnel,
-assurer l'assistance et la formation nécessaires,
-concevoir des équipements compatibles avec les conditions de développement des Pays en Voie de Développement(taille,coût...)

Quelques opérations ont spécialement été retenues,à partir des besoins exprimés localement,de manière à apporter des réponses aux goûlots d'étranglements relevés.Aussi,seules les opérations de rapâge,pressage,emottage-défibrage,cuisson et séchage ont-elles été mécanisées dans un premier temps.

D'autre part,pour prendre en compte les aspects énergétiques,un procédé de fermentation méthanique en continu par la technique du digesteur "TRANSPAILLE" a été retenu.

Cela permet de valoriser les déchets sous force de biogaz qui alimente un groupe électrogène permettant l'autonomie énergétique de la ligne du point de vue mécanique.

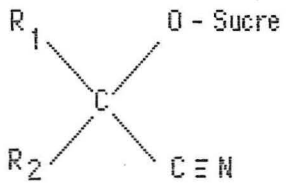
La démarche suivie a été la suivante:
-analyse des technologies traditionnelles et inventaire des differentes solutions technologiques proposées,
-conception et tests des équipements en France,
-transfert des équipements et suivi expérimental chez un partenaire scientifique en régions chaudes,l'Institut National des Plantes à Tubercules à LOME(TOGO).

En conclusion,les équipements proposés font l'objet depuis Mai 1986 d'un suivi expérimental en conditions réelles d'utilisation.Les premiers résultats montent la fiabilité des choix techniques retenus.Néanmoins,le problème de la toxicité du manioc reste posé.Aussi,la poursuite de ce programme reste-t-elle nécessaire sur les aspects détoxification,afin de garantir des taux résiduels de cyanures minimes.

2.3 TOXICITE DU MANIOC

Le caractère toxique du manioc est dû à la présence d'acide cyanhydrique HCN dans les racines.Les cyanures ne se trouvent pas à l'état libre dans le manioc mais à l'état lié,sous forme de composés cyanogénétiques.
D'une manière pratique,on rencontre deux grandes variétés de manioc:
-manioc "amer",riche en composés cyanogénétiques,
-manioc "doux",pauvre en ces composés.
Cette classification est cependant bien arbitraire car les teneurs en composés cyanogénétiques sont grandement influencées par les conditions culturales, climatiques,édaphiques...
Enfin,malgré leur caractère toxique,les variétés amères sont de loin les plus cultivées.Elles offrent de meilleurs rendements,une meilleure résistance aux prédateurs,une qualité organoleptique du produit final plus appréciée...

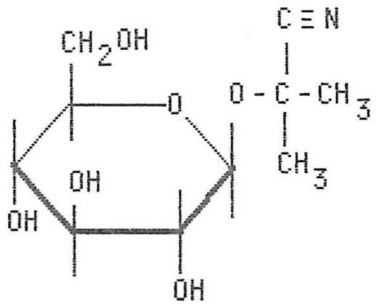
Les composés cyanogénétiques sont principalement la linamarine (de 95 à 97%),et,accessoirement la lotaustraline.Ce sont des hétérosides (ß-glucosides),constitués d'un sucre et d'un aglycone,de formule générale:



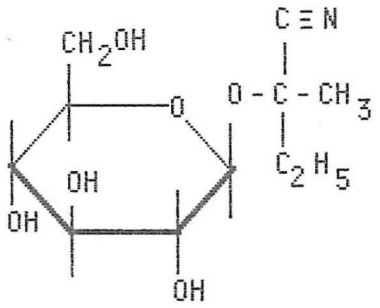
R_1, R_2 =H,aryle

Sucre=glucose...

Dans le cas du manioc,les composés cyanogénétiques sont:



LINAMARINE



LOTAUSTRALINE

Ces glucosides ont pour précurseurs des acides aminés: ex.,la L-valine pour la linamarine.De plus,il semblerait que la biosynthèse s'effectue essentiellement au niveau des feuilles (riches en acides aminés) et que le glucoside formé soit par la suite transporté dans toute la plante ,et, en particulier, dans les racines pour y être stocké.

Pour la racine,il existe en plus un gradient radial de concentration,allant de l'intérieur(cortex) à la périphérie (écorce),ainsi qu'un gradient longitudinal (l'extrémité de la racine étant plus riche en cyanoglucosides).

Quelques valeurs (d'après DE BRUIJN,1971) en poids frais:

-écorce:400 à970 ppm d'HCN,

-cortex:36 à 240 ppm d'HCN.

Ces composés cyanogénétiques subissent une dégradation dès l'arrachage des racines du sol.Cette dégradation se déroule en deux étapes qui sont les suivantes:

1)hydrolyse enzymatique sous l'effet d'une enzyme endogène,la linamarase:

2)dissociation chimique aboutissant à la formatioon d'acide cyanhydrique:

Enfin,si la toxicité des composés cyanogénétiques comme des cyanohydrines reste potentielle,la présence des cyanures peut conduire à des intoxifications importantes:

< 50 ppm:non toxique,

50 à 100 ppm:moyennement toxique,

>100 ppm:dangereusement toxique(la dose létale est de 50 à 60 mg pour un homme adulte).

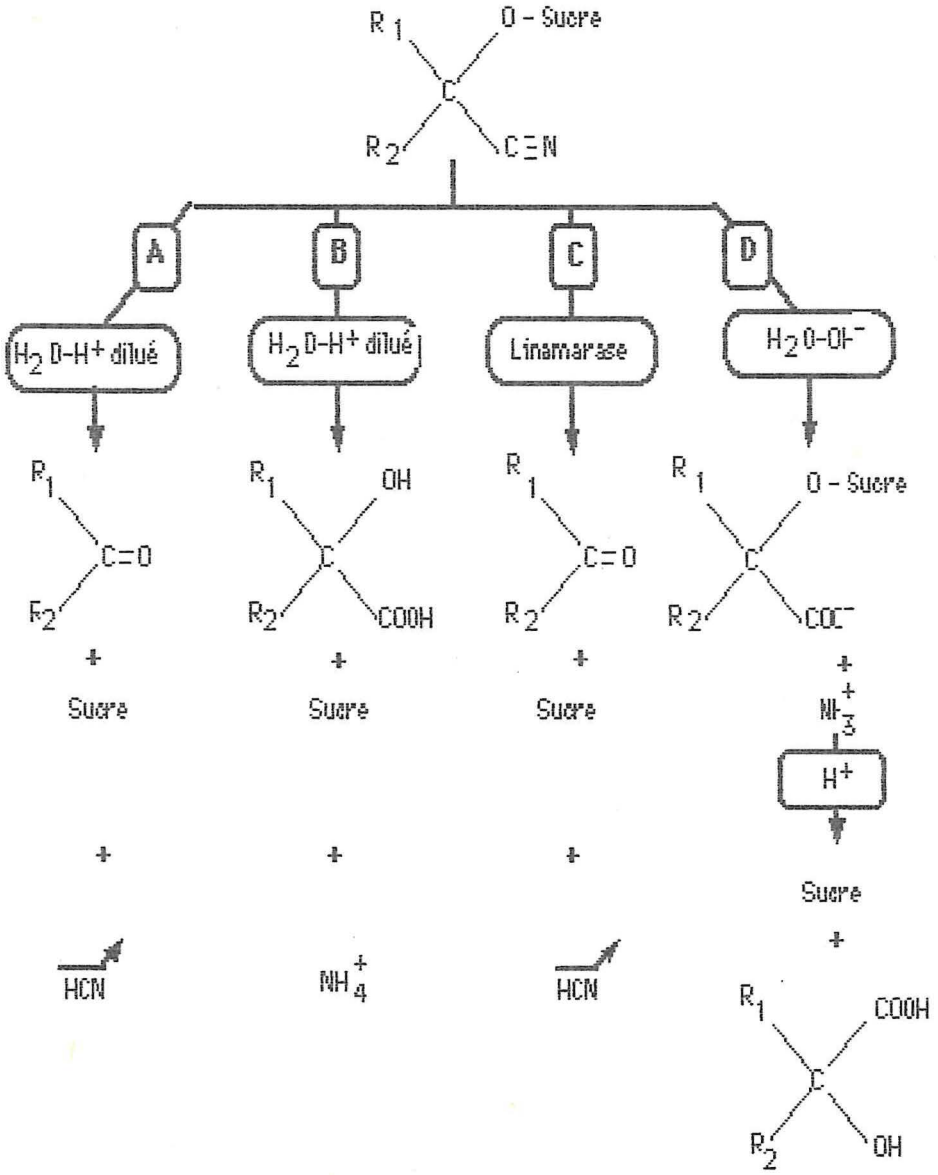
Des intoxifications chroniques conduisent à:

-blocage de la glande thyroïdienne,d'où risques de goitres,

-crétinisme,démyélination.

2.4 MECANISMES DE DETOXIFICATION

Comme il a été dit précedemment,les composés cyanogénétiques subissent une dégradation importante.Les différentes voies de detoxification sont les suivantes:



Dans le cas de la transformation du manioc en gari seule la voie enzymatique C nous intéresse.La linamarase est une enzyme endogène,dont l'activité est maximale sous certaines conditions: pH =5.5-6; t°=37°C.L'hydrolyse enzymatique est suivie d'une dissociation chimique ,qui peut être également enzymatique;cette dissociation se fait à pH supérieur à 5.5.

Les cyanohydrines sont très instables à un pH voisin de 11 et se transforment en HCN toxique mais volatile (t°=26°C) et soluble donc facilement éliminable par lavage ou évaporation.

Ainsi,pour obtenir un produit final de bonne qualité,donc de faible toxicité,il convient de favoriser:

-l'hydrolyse des glucosides,

-la dissociation des cyanohydrines,

-l'évacuation de HCN par lavage ou évaporation.

Ces considérations sont à prendre en compte à chaque étape de la transformation du manioc en gari,à savoir:

-lavage des racines entières,

-au niveau du râpage:celui-ci permet de mettre en contact la linamarase et son substrat (la linamarine) et ainsi de dégrader le glucoside plus rapidement,

-au niveau de la fermentation:la dégradation des glucosides se poursuit danns cette étape mais compte-tenu des variations des conditions physico-chimiques de la pulpe(baisse du pH aux environs de 4 au bout de 24 h),cette étape est limitante tant pour l'activité enzymatique de la linamarase que pour la dissociation chimique des cyanohydrines.toutefois,pour améliorer cette étape,quelques techniques simples peuvent être appliquées:

*lavage de la pulpe avant fermentation,

*addition d'eau ,

*addition d'enzymes exogènes,

*bonne aération facilitant l'évacuation d'HCN.

-au niveau du pressage:il permet d'éliminer avec les jus de pressage,une grande quantité de cyanures,

-au niveau de la cuisson:la température qui est très élevée permet d'évacuer HCN qui est très volatile.

Enfin,l'objectif des travaux actuels conduits par le CEEMAT et le sevice AOB consistent à:

-connaître l'influence des différents traitements technologiques de la ligne existante sur l'élimination des composés cyanogénétiques,

-apporter des solutions simples aux procédés traditionnels pour réduire la toxicité,

-rechercher des solutions à l'échelle semi-industrielle en particulier en utilisant des souches microbiennes exogènes étudiées par ailleurs.

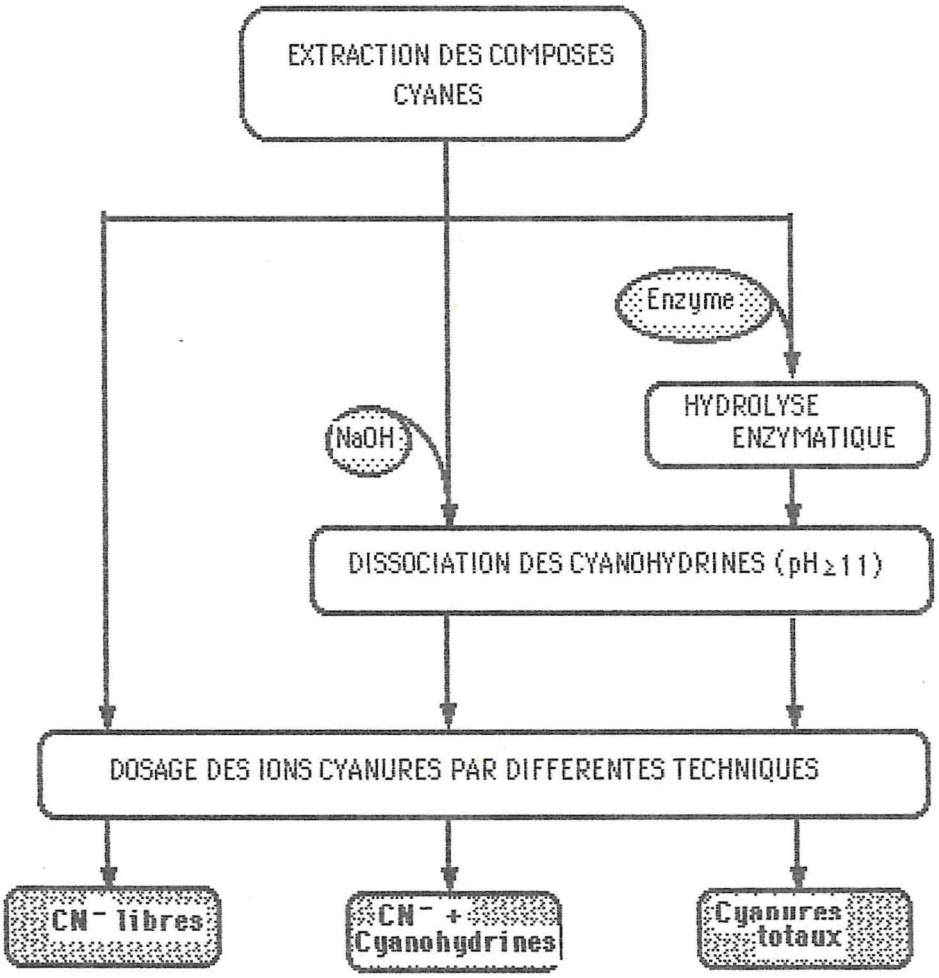
De ce fait, des méthodes analytiques doivent être mises en œuvre pour déterminer les cyanures sous les trois formes,dans des conditions de réalisations simples pour être développées in situ

3 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE

Les recherches sur la toxicité des cyanures,les dosages des composés cyanogénétiques sont importantes surtout dans les pays en rapport direct avec ces problèmes.Un nombre important de méthodes de dosage variées ont été proposées à ce sujet dans des publications.Cependant,ces techniques,si elles permettent une approche très juste du problème et donnent des résultats exacts,sont souvent sophistiquées.

3.1 PRINCIPE GENERAL DES DIFFERENTES METHODES

Compte-tenu du mécanisme de dégradation des composés cyanogénétiques vu précédemment ,tous les dosages des cyanures sont basés sur le principe suivant:



Remarque:les quantités respectives de chaque forme sont obtenues par différence.

3.2 METHODES DE DOSAGE DES IONS CYANURES

Le dosage des ions cyanures peut s'effctuer à deux niveaux:

-CN^- libres,

-acide cyanhydrique issu de CN^-: $CN^- + H^+ \longrightarrow HCN$

Lesméthodes de dosages sont nombreuses et peuvent être regroupées de la manière suivant:

*Méthodes titrimétiques

-titrarion des CN^- avec $AgNO_3$(INGERSOLL et Coll.,1983),

-titration au sel de nickel-Titriplex,

-méthode de détection:réaction au sulfure de cuivre avec formation du complexe cuprocyanate (CHARLOT,1973).

*Méthodes colorimétriques

-dosage à la chloramide T et à la pyridine bispyrazolone ou à l'acide barbiturique(COOKE,1978),

-dosage au picrate alcalin (IKEDIOBI et al,1980).

*Méthodes électrochimiques

-dosage avec une électrode spécifique (INGERSOLL et Coll.,1983)

*Méthodes par chromatographie gazeuse (NOTA,1982)

En réalité,seules deux techniques sont véritablement utilisées lors des diverses analyses;ils'agit de l'ionométrie et de la colorimétrie.

3.3 METHODES DE DOSAGE DES COMPOSES CYANOGENETIQUES

Ces méthodes permettent de doser les trois formes de ccomposés dont la linamarine.Ce dosge est rendu possible grâce à des réactions enzymatiques de divers types.En effet,l'hydrolyse du glucoside peut s'effectuer par diverse méthodes:

-hydrolyse acide,

-auto-hydrolyse:la linamarine est dégradée par la linamarase endogène;l'auto-hydrolyse est en général précédée d'une distillation pour séparer l'acide cyanhydrique libéré,le dosage s'effectuant ensuite par réaction colorimétrque au picrate alcalin,

-hydrolyse enzymatique sous l'action d'une enzyme exogène,après inactivation de l'enzyme endogène;pour ce procédé,deux types de réactions colorimétriques sont possibles suivant le type de dosage effectué:

+dosage manuel au picrate alcalin ou à la pyridine pyrazolone,

+dosage automatique à la pyridine pyrazolone.

Les principales propriétés de ces méthodes sont présentées dans le tableau donné plus loin.

Il a été récemment proposé une autre méthode pour le dosge de la linamarine.Il s'agit d'une chromatographie sur papier basée sur une réaction avec la p-anisaldéhyde.Cette méthode a la particularité d'être utilisée pour tous les tissus,animaux et végétaux(ZITNAK,1977).

En réalité,toutes ces méthodes se heurtent à des problèmes existant à trois niveaux:

-hydrolyse complète des glucosides,

-isolement du cyanure à partir du mélange,

-détermination des cyanures.

C'est la méthode autolytique qui pose le plus de problèmes et c'est elle qui est le moins utilisée.Toutefois,quelques améliorations ont pu être apportées en remplaçant le système de distillation par l'utilisation d'un récipient contenant de l'hydroxyde de sodium.Ce dernier piège les cyanures libérés lors de l'hydrolyse, pendant les 18 à 24 heures d'incubation.

	Auteurs	Réactifs	Matériel	Equipt	Nb/j	Sensib.	Inconvénients
AUTOLYSE	**WOOD** 1965 (distillation à l'acide dans du carbonate de sodium)	Acide Picrique	Manioc frais	Spectro-photomètre 530 nm	-	0.01/1 µg/ml	-hydrolyse incomplète -variations d'activité de l'enzyme -longue période d'incubation -réactions secondaires
HYDROLYSE ENZYMATIQUE	**IKEDIOBI** 1980	Picrate alcalin	Manioc frais + Produits dérivés	Spectro-photomètre 460 nm	40	limite de détection 0.16 µg/ml	Interférences entre picrate et acétone: variation de 1 à 2 % du résultat
	POOMAN HAHN 1984	Pyridine pyrazalone	Manioc frais + Produits dérivés	Auto-analyser Technicon	300	0.4/400 µg/ml	toxicité des produits utilisés **mais:** -méthode performante (flux continu) -peu d'interférences, hydrolyse en 5 min -systeme clos (pas de perte en HCN)

3.4 EVOLUTION DES METHODES AU LABORATOIRE

Un des problèmes posés par le dosage des composés cyanures est le suivant : comment faire face à la perte en ions cyanures sous forme d'HCN?

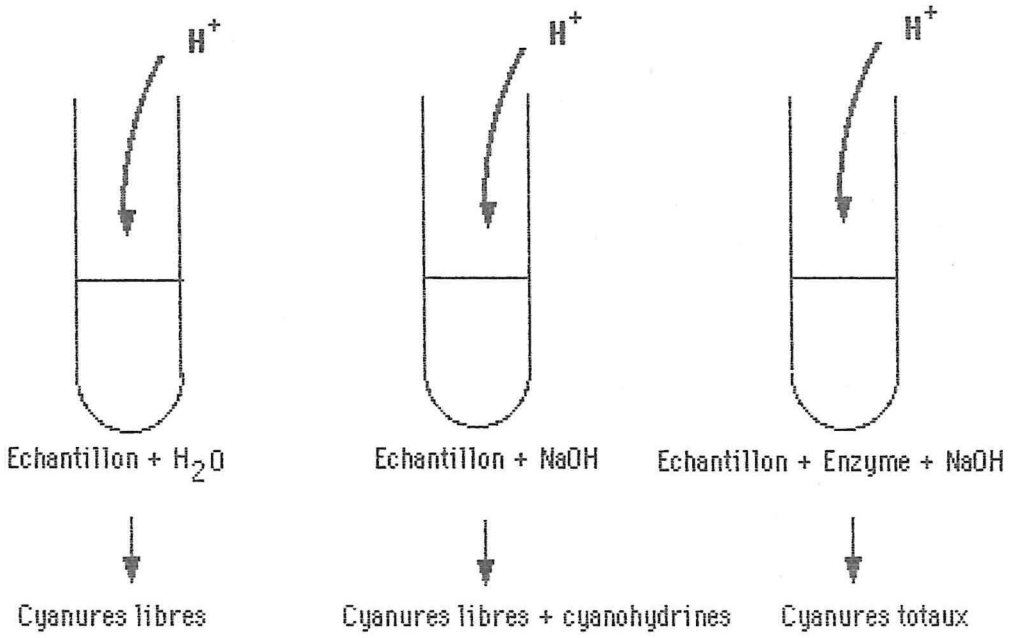
Des éléments de réponse ont été apportés au fur et à mesure des recherches.Il s'agit surtout d'une évolution dans la mise en œuvre de nouveaux procédés ,intervenant localement sans modifier le principe du dosage et dans le sens de l'amélioration des conditions d'expérience(rapidité,automaticité...)

Les travaux de J. ROMERO (laboratoire AOB) donnent l'exemple d'amélioration du procédé.En appliquant la méthode utilisée en respirométrie appliquée aux sols où les carbonates ,transformés en CO_2 sont récupérés par piégeage dans la soude,il est possible de transformer les ions cyanures en HCN gazeux puis de les piéger dans la soude en vue du dosage.

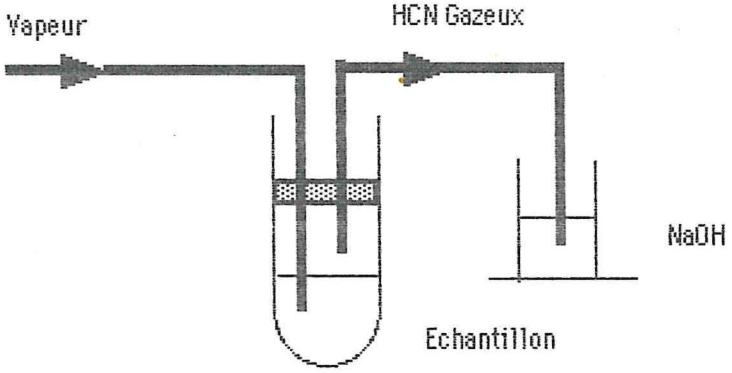
Le dosage utilisé est basé sur une réaction colorimétrique et effectué sur Autoanalyser TECHNICON.

Deux procédés ont été successivement testés:
+entraînement à la vapeur,
+dialyse adaptée sur le manifold

1.) Entraînement à la vapeur



Remarque: Les ions H^+ déplacent l'équilibre dans le sens de la formation de HCN à partir des CN^-



HCN est entraîné à la vapeur ,puis est récupéré dans de la soude.

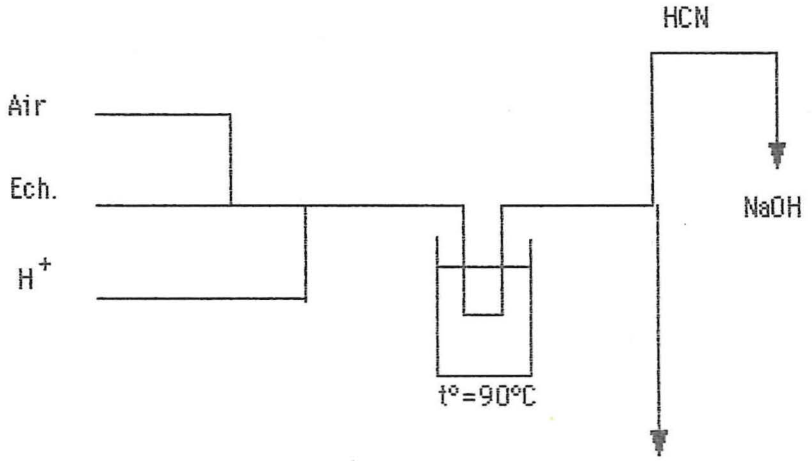
Remarques:

*Ce procédé marche assez bien pour le dosage des CN^- et cyanohydrines mais le dosage pour les cyanures totaux n'est pas satisfaisant([cyanures totaux]≤[CN^-+cyanohydrine]),

*L'entraînement à la vapeur équivaut à une dilution.Or les CN^- libres sont présents à de faibles concentrations,aussi ce procédé présente-t-il une limite de sensibilité.

2.) Montage sur TECHNICON

Cette technique permet de concentrer de faibles quantité de cyanures.Elle a un deuxième avantage par rapport à la méthode précedente puisque elle demande moins de travail,tout se passant automatiquement sur le manifold;même avec ce procédé quelques difficultés ont été rencontrées pour déterminer les cyanures totaux.



En outre,ces deux méthodes font appel à une réaction colorimétrique avec le thyocanate mercurique;ce réactif a l'inconvénient de réagir non seulement avec le CN^- mais avec d'aures ions comme les Cl^- qui sont égalemment présents dans la pulpe de manioc.Aussi,quand on dose les CN^-,on dose également les Cl^-,ce qui fausse le résultat final.

A la suite de ceci,un double dosage a été tenté,avec dosage des CN^-+Cl^-,puis dosage des Cl^- en bloquant les CN^-,mais ce bloquage intervient aussi sur celui des ions Cl^-.

Il a fallu également faire face au problème de l'instabilité de la gamme CN^-;deux gammes équivalentes ont été faites(1meq CN^- <==>1 meq Cl^-,soit 1µg/ml CN^-=1µg/ml Cl^-),mais les pics obtenus pour chacune des deux gammes sont différents du fait que les deux ions,bien que semblables, n'ont pas la même solubilité.

Face au problème engendré par l'utilisation du thyocyanate mercurique à cause de sa non spécificité,il a été retenu d'utiliser comme réatif la pyridine bipyrazolone,malgré les dangers présentés par ce produit.Les mêmes essais ont été conduits avec ce nouveau réactif et les résultats obtenus satisfaisant.

4. METHODES ANALYTIQUES RETENUES

Dans le contexte du programme CEEMAT,les méthodes analytiques retenues doivent être appliquables sur le terrain avec un mode opératoire aisé et des conditions pratiques les moins onéreuses possibles.Elles doivent répondre aux contraintes suivantes:

*simplicité du protocole expérimental et du matériel,

*reproductibilité,

*sensibilité,exactitude.

C'est dans cettte optique que deux méthodes ont été plus particulièrement développées.Ils'agit:

.d'une méthode électrochimique:ionométrie,utilisant une électrode spécifique(électrode ORION)qui permet de doser les ions cyanures.

.du dosage manuel par colorimétrie,adapté à parir du dosage automatique en flux continu réalisé sur TECHNICON;cette méthode permet de doser les trois formes de composer cyanogénétiques.

4.1 METHODE ELECTROCHIMIQUE:IONOMETRIE

Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une électrode spécifique ORION.

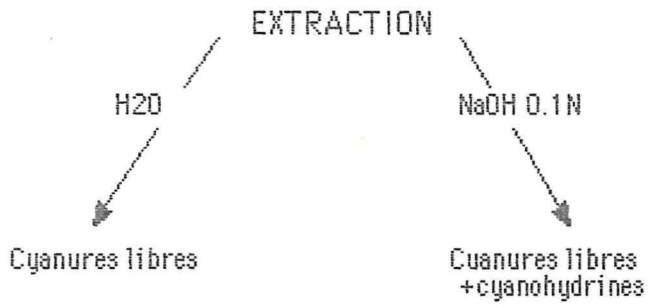
+Principe de l'électrode

L'electrode est constituée d'une membrane polycristalline de Ag_2S et AgI

$AgI + 2CN^- \text{----}> Ag(CN^-)_2 + I$

Les limites de détection sont de 0.02mg/l.

+Rappel du principe de dosage



+protocole expérimental

On extrait les ions CN^- et les cyanohydrines respectivement dans de l'eau et dans de la soude.Après agitation,les solutions sont filtrées et sont prêtes à être analysées au ionomètre.

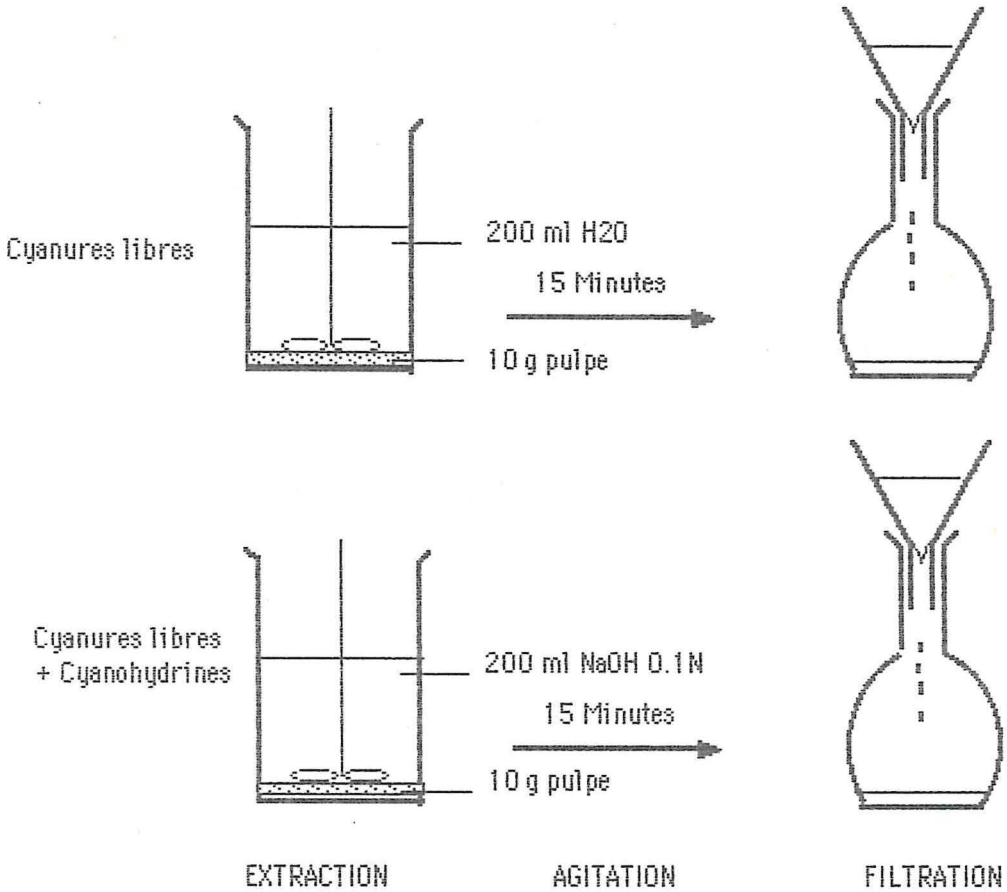
Dans le même teemps,on réalise des gammes d'étalonnage assez larges,dont on soit sûr que les points choisis encadreront les concentrations des points à doser:

gamme pour les CN^- libres :0.5-2.5 µg/ml

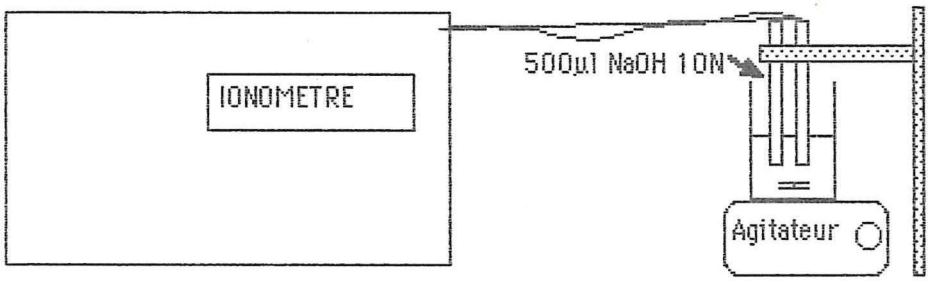
gamme pour les CN^- + cyanohydrines:2.5-15 µg/ml

La solution mère de KCN utilisée a une concentration en CN^- de 100mg/ml.

Les principales opérations sont représentées dans le schéma suivant:



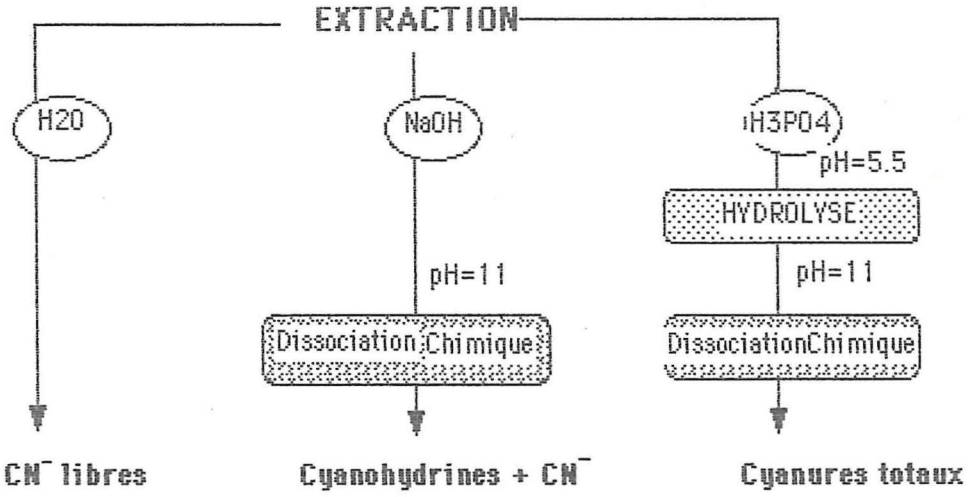
Le contenu de chaque fiole est transvasé dans un godet pour pouvoir y plonger les électrodes de mesure(volume utilisé 50 ml)



Lors de cette manipulation,il est nécessaire de respecter certaines conditions comme:
-agir rapidement pour éviter le dégagement d'HCN,
-maintenir l'agitation pendant la mesure pour favoriser le transport des ions cyanures,
-d'analyser des volumes d'échantilons constants(50ml),
-de faire les mesures sur des échantilllons de même force ionique,en ajoutant de la soude 10N en excès(l'extrait obtenu contient outre des CN^-,des Cl^- ,des I^- pouvant interférer avec les cyanures).

4.2 METHODE COLORIMETRIQUE:DOSAGE MANUEL

+Rappel du principe de dosage



+Protocole expérimental

Les principales étapes de cette manipulation sont:

a/l'extraction. Elle s'effectue--->à l'eau pour obtenirles CN^-,

--->à la soude pour obtenir les CN^- +cyanohydrines,

--->à l'acide pour obtenir les cyanures totaux,l'acide phosphorique permettant d'inactiver l'enzyme endogène qui est remplacée par la linamarase exogène.

b/la réalisation d'une gamme d'étalonnage et de blancs en vue de la réaction colorimétrique.

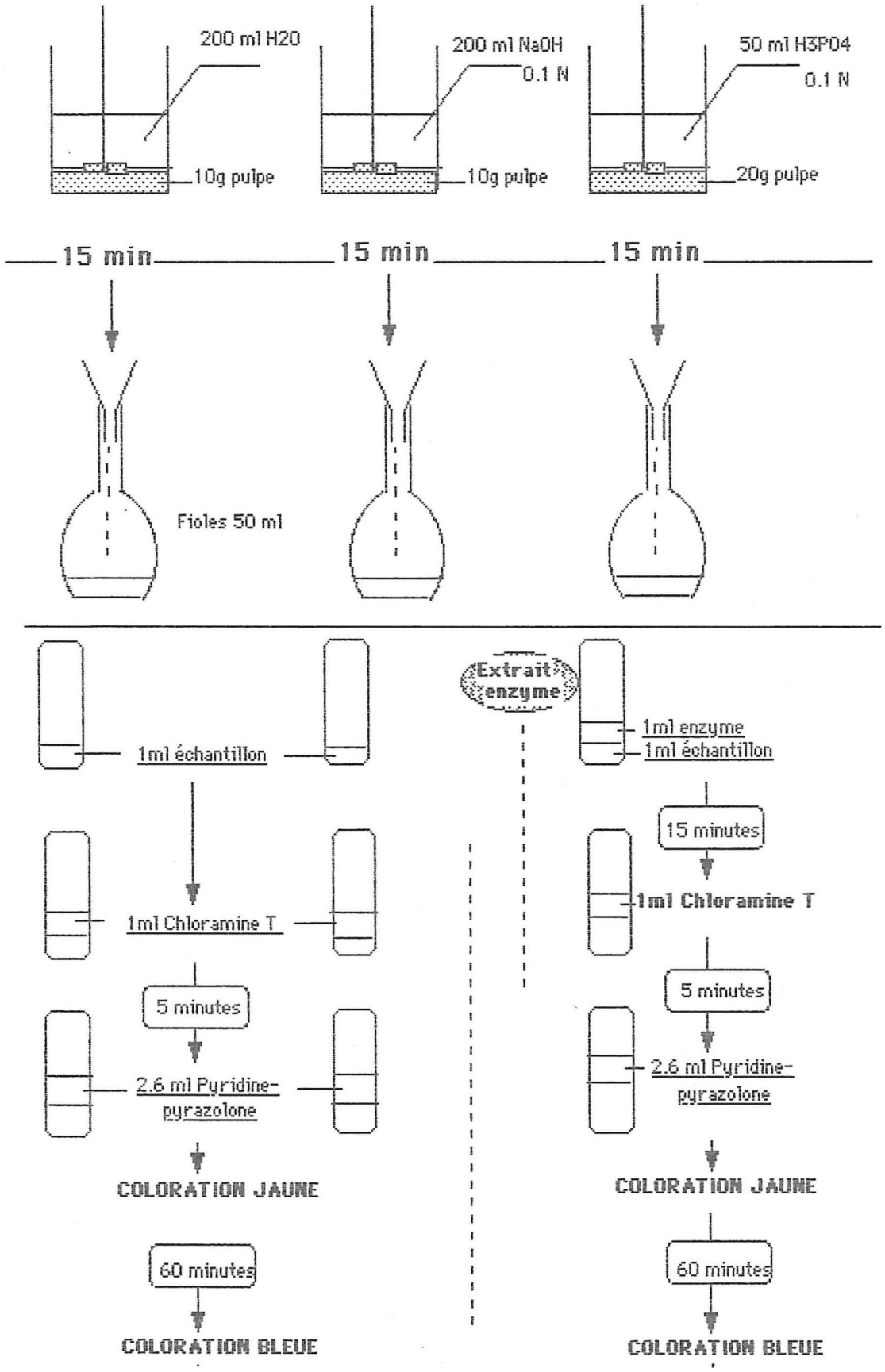
Trois concentrations constituent la gamme:2.5,5.0,7.5 µg/ml

c/la réaction colorimétrique:

Les produits (échantillons et réactifs) sont mis dans un tube pyrex bouché afin d'éviter le dégagement de HCN et les réactions secondaires.Le cyanure contenu dans l'échantillon est transformé en chlorure de cyanure (CNCl) par réaction avec la chloramine T.Par addition de la pyridrine-bispyrazolone,il se forme une coloration bleue;l'absorbance de la solution est lue à 620 nm.Les volumes et les temps de réaction constants entre chaque addition de réactifs ont été calculés à partir du manifold du Technicon.Tout comme dans le dosage automatique,les mesures doivent être effectuées dans les mêmes conditions.

En ce qui concerne l'addition d'enzyme exogène,le court temps de contact permet d'éviterla formation de réactions secondaires et d'interférences.On aura pris soin de préparer au préalable l'extrait enzymatique (il peut se conserver plusieurs semaines à 0°C) et de tester son activité.

DOSAGE COLORIMETRIQUE MANUEL

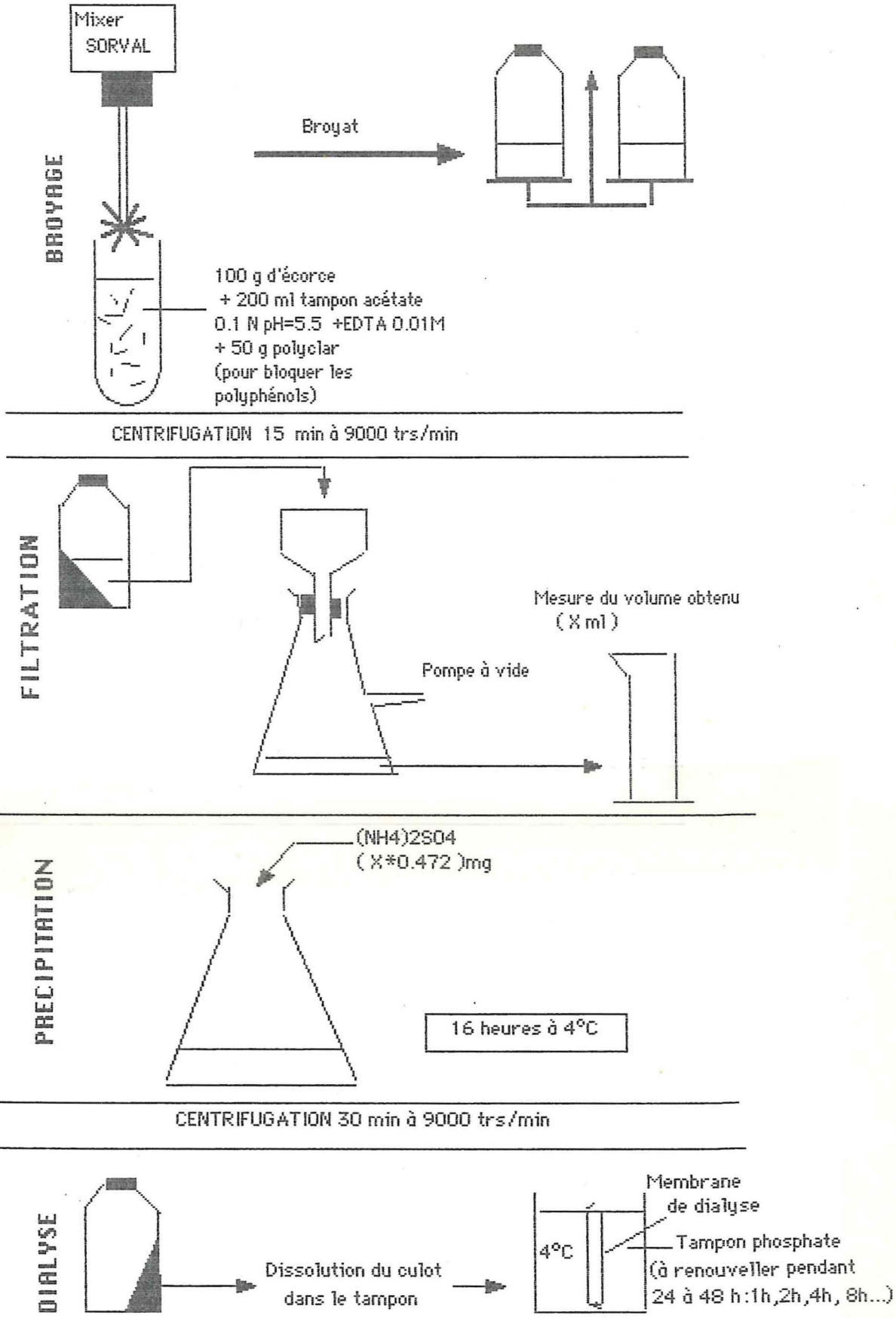


d/l'extraction de la linamarase

La linamarase est l'une des principales enzymes contenues dans l'écorce de manioc où son activité est de l'ordre de 270 ppm(en poids frais) d'HCN libéré par minute.

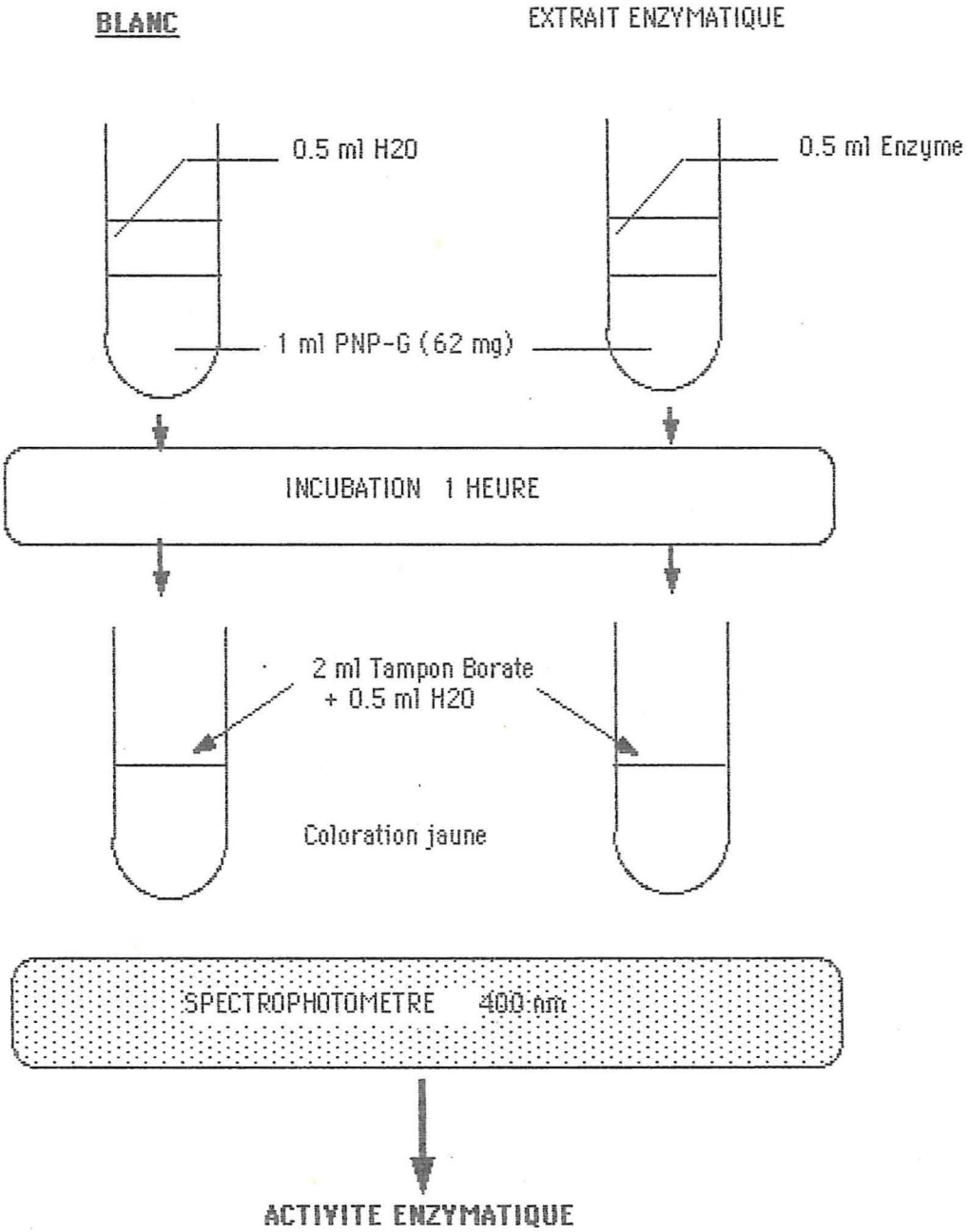
On commence par extraire la linamarase de l'écorce par broyage,le broyat est ensuite centrifugé.Les enzymes se retrouvent dans le surnageant que l'on filtre.L'étape suivante consiste à séparer les protëines des autres molécules également contenues dans le filtrat.Le procédé de séparation est basé sur la différence de solubilité des protéines dans une solution saline.L'addition d'une quantité importante de sulfate d'ammonium (saturante à 70%)très soluble dans l'eau et à force ionique très élevée provoque la diminution de la solubilité des protëïnes.Les enzymes,dont la linamarase se retrouvent après 16h de précipitation à 4°C sous forme de précipité.Ce précipité est centrifugé et le culot d'enzymes est dissoud dans le tampon,prêt à être dialysé.La dialyse permet de séparer la linamarase de grand poids moléculaire des solutés de petit poids moléculaire comme les sels d'ammonium.On utilise pour se faire une membrane semi-perméable qui retient l'enzyme tandis que les sels passent à l'extérieur dans le tampon phosphate ,jusqu'à ce que l'équilibre entre les deux milieux soit atteint.Le tampon phosphate est changé de nombreuses fois.On dispose alors d'un extrait de linamarase dont l'activité peut être testée.

EXTRACTION ENZYMATIQUE



e/activité enzymatique de la linamarase

L'activité de la linamarase est dosée en utilisant le p-Nitophenyl-ß-glucoside comme substrat.On fait réagir l'enzyme sur son substat pendant une heure d'incubation;la réaction est stoppée par additon de tampon borate.Il se développe une intense coloration jaune dont la mesure est éffectuée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 400nm.



Une unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme qui produit un changement de 0.001 dans l'absorbance à 400nm par minute.Le PNP-Glucoside n'étant pas un substrat spécifique à la linamarase ,il est susceptible de réagir avec d'autres ß-glucosidases contenues dans l'extrait non purifié.

Resultats d'un dosage d'activité sur deux essais:

DO à400nm:0.832 et 0.842; moyenne 0.837 pour 500µl d'enzyme,d'où une activité de 1674 unites/ml.

Cette activité peut paraître importante,mais cela est dû au fait que l'extrait ne contient pas que de la linamarase mais aussi d'autres β-glucosidases et que le substrat n'est pas spécifique de la linamarase et qu'il est donc dégrader rapidement .

4.3 Conclusion

En réalité ,ces deux techniques de dosage sont complémentaires.La ionométrie apporte la simplicité(manipulations,matériel...);elle constitue une bonne méthode de contrôle des concentrations en cyanures,ce qui est tout à fait approprié au travail demandé sur le terrain.La colorimétrie a surtout l'avantage de l'exactitude,la précision et permet un survol complet du dosage des cyanures.

Il aurait été intéressant d'adapter la technique manuelle à la iomométrie,c'est-à-dire d'effectuer un dosage enzymatique,les cyanures libérés étant déterminés avec l'électrode.Ilest vraisemblable que les problèmes concernant l'hydrolyse enzymatique soient les mêmes.Une étude plus approfondie sur l'enzyme considérée pourrait aussi apporter de grandes améliorations.

	IONOMETRIE	COLORIMETRIE
AVANTAGES	-Simplicité de l'appareillage: une électrode et un lecteur, -Pas de réactifs, -Rapidité, -Sensibilité :0.02 à 26 µg/l	-Appareil de mesure accesssible et d'un emploi facile, -Méthode assez rapide(40 analyses/j), -Bonne sensibilité, -Dosage des cyanures sous les 3 formes
INCONVENIENTS	-Actuellement dosages uniquement des ions cyanures libres, travail complémentaire à envisager	-Emplois de réactifs toxiques,dangereux d'où travail sous hotte, -Temps de réactions à bien respecter -Réaction enzymatique soumise à de nombreuses conditions

4 DOSAGES REALISES : RESULTATS

Nous donnerons ci-aprés quelques résultats de dosages éffectués en ionométrie,permettant de montrer quels types d'essais ont été réalisés:

*Manioc frais (par rapport à la matière humide)

écorce:120 ppm
pulpe fraîche (humidité:65%)
cyanure libre:22 ppm
cyanure + cyanohydrine :50 ppm

*Influence du séchage solaire sur l'élimination des cyanures

	Cyanure libre	Cyanure + cyanohydrine
pulpe fraîche	35ppm	61ppm
pulpe séche	traces	26ppm

Le séchage permet d'éliminer une grande partie des cyanures.

*Suivi de la fermentation

Les essais ont portés sur l'aptitude d'une souche exogéne avec laquelle on ensemence la pulpe de manioc à detoxifier le manioc:
-essai sur fermenteur régulé de 2 litres

Heures	Cyanhydrines(ppm)
0	25
13	19.5
15	15
18	12.6
20	7.2

71% des cynohydrines sont éliminées.
Remarque:les cyanures trés volatiles n'ont pu être mesurés.

-essai en erlenmeyers

Echantillons	Heures	Cyanures (ppm)	Cyanhydrine/ppm	pH
pulpe fraiche	0	60	0	6.9
Echantillon	24	19	1	4.2
non ensemencé	48	28	0	3.8
Echantillon	24	17	-	4.1
ensemencé	48	24	1	3.7

Nous notons au bout de 24 heures une accumulation de cyanohydrines vraisemblablement due aux conditions de pH qui doivent être limitantes tant pour la détoxification naturelle que pour celle recherchée.

*influence du pressage

Le pressage permet d'éliminer une quantité importante de cyanures:

	pulpe fraîche (ppm)	pulpe fermentée (ppm)	pulpe pressée (ppm)	jus de presse (µg/ml)
CN	19	10	7	2.9
CN +Cyano.	105	65	26	73

Nous n'avons pu de manière systématique faire une comparaison entre mesures effectuées au ionomètre et avec la méthode manuelle;en effet,la mise au point de la méthode manuelle à partir du manifold a mobilisé une partie imporante de mon temps et une fois la méthode mise au point,le ionométre n'était plus disponible ,étant utilisé sur le terrain au Togo.Une mesure a été faite permettant de montrer que les résultats entre les deux méthodes sont voisins:

Pulpe fraîche(ppm)	CN libre	CN + Cyanohydrine
Ionométre	18	50
Méthode manuelle	15	51

BIBLIOGRAPHIE

CHARLOT G.
"Les réactions chimiques en solutions aqueuses"
Editeur Masson

CHUZEL G.
"Ligne de transformation du manioc en gari:influence es traitements technologiques sur l'élimination des composés cyanogénétiques"
Etude bibliographique,1985

COOKE R.
"An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (Manihot Esculenta Crantz)"
J. Sci. Fd Agric.,1978,vol 29,p345-352

COOKE R.,DE LA CRUZ E.
"An evaluation of enzymatic and autolytic assays for cyanide in cassava(Manihot Esculenta Crantz)",
J. Sci. Fd Agric.,1982,p1001

IKEDIOBI C. O.,ONIA G. O. C.,ELUWAH C. E.
"A rapid and inexpensive assay for total cyanide in cassava(Manihot Esculenta Crantz) and cassava products",
Agric. Biol. Chem.,1980,vol 44,p2803-2809

IZOMKUN,ETHIOBHIO,UGOCHUKWU
"Comparison of an alkaline picrate and a pyridine-pyrazolone method for the determination of hydrogen cyanide in cassava and cassava products"
J. Sc. Fd Agric.,1984,vol 35

LEHNINGER
"Biochimie"
Editeur Flamarion

NAMBISSAN B. SUNDARESAN S.
"Spectrophtometric determination of cyanoglucosides in cassava",
J. Assoc. Anal. Chem.,1984,vol 67

WILLIAMS H.
Estimation of hydrogen cyanide released from cassava by organic solvents"
Expl.Agric. ,1979,vol 15,p393-399

WILLIAMS H.
"Estimation of cyanide with alkaline picrate",
J.Sc. Fd Agric.,1980,vol 31

WOOD T.
"The cyanogenic glucoside content of cassva and cassava products",
J. Sci. Fd Agric.,1965,vol 16

WOOD T.
"The isolation ,prpertiesand enzymatic breakdown of linamarin from cassava"
J. Sc. Fd Agric.,1966,vol17

ZITNAK A.
"Asay methods for hydrocyanic acid in plant tissues and their application in studies of cyanogenic glucosides in Manihot Esculenta Crantz"
J. Sc. Fd Agric.,1984,vol 35

ZITNAK A.
"Determination of linamarin in biological tissues"
Analyt. Biochem.,1977,vol77,p 310-314