



germination

PRÉSERVER L'AGRO-BIODIVERSITÉ DANS L'OCÉAN INDIEN

Protocole de détermination de la teneur en cyanure des tubercules de manioc



Lionel Scherschel (agronome VSC, UMR PVBMT)

*Copil du projet Germination III
3-5 juin 2025*

France/Cirad



« Ce projet est co-financé par l'Union européenne et la Région Réunion.
L'Europe s'engage à La Réunion avec INTERREG »

Matériel requis

- **Le kit A test de cyanure de Bradbury et al., (1999)**, contenant les éléments suivants :

1. Le Protocole A ;
2. Une balance en plastique avec un poids de 100 mg collé dans une cuillère, pour peser 100 mg de chair interne de tubercule de manioc ;
3. Trente petits flacons en plastique à fond plat avec couvercles à vis ;
4. Deux pipettes graduées en plastique de 1 ml ;
5. Cent disques de papiers tampons ;
6. Cent feuilles de papier picrate jaune collées sur des bandes de plastique transparentes ;
7. Un nuancier avec dix nuances de couleurs correspondant à 0 – 800 ppm de cyanure total ;
8. Dix papiers standards roses contenant de la linamarine (ppm de cyanure indiquée sur l'étiquette) ;
9. Dix disques de papier tampon/enzyme. Ces papiers présentent une petite tache noire afin de ne pas les confondre avec les papiers tampons.

- **Des échantillons de tubercules de manioc fraîchement récoltés.** Prévoir plusieurs tubercules par variété.

- **Un grand couteau et un petit couteau**

- **Des étiquettes de notation**

Pour accéder au kit A :

- Site web d'information : https://biology-assets.anu.edu.au/hosted_sites/CCDN/five.html
- Mail de contact pour commander un kit : konzo@anu.edu.au
- Tarif : gratuit pour les travailleurs des pays en développement, facturé 700 dollars australiens pour les travailleurs des pays développés.

Principe de la méthode au papier picrate

Les tubercules de manioc contiennent des glycosides cyanogènes dans la peau, dans le cortex et dans le parenchyme (chair interne) responsables de l'amertume et de la toxicité potentielle. Lors de la préparation d'un échantillon de chair interne de manioc frais, la dégradation des tissus entraîne une hydrolyse enzymatique des glycosides cyanogènes. Cette dégradation libère du cyanure d'hydrogène qui réagit avec le papier picrate, ce qui fait assombrir son pigment de couleur. La variation de couleur du papier picrate permet de mesurer la quantité de cyanure libérée, par comparaison avec un nuancier composé de couleurs associées à des teneurs potentielles de cyanure.

La méthode au papier picrate permet une évaluation de la teneur potentielle en cyanure des tubercules de manioc en fonction de leur poids frais. Les résultats sont exprimés en ppm (partie par million) équivalent à l'unité mg d'HCN/kg de poids frais.

1) Prélever 100 mg de chair interne du tubercule

- a) Couper transversalement 1 à 2 mm d'épaisseur au centre du tubercule à l'aide du grand couteau (figure 1).
- b) Retirer la peau externe et découper un secteur à l'aide du petit couteau (figure 1).
- c) À l'aide de la balance en plastique fournie dans le kit ou d'une balance électronique de précision, prélever des morceaux de chair interne jusqu'à atteindre 100 mg (figure 2).



Figure 1 : coupe transversale d'un tubercule de manioc et préparation d'un secteur.



Figure 2 : pesée de 100 mg de morceaux de chair interne de tubercules de manioc.

L'échantillonnage doit idéalement être réalisé à partir d'un mélange de deux ou plusieurs tubercules de différentes plantes, en raison de la variabilité de la teneur en cyanure entre les tubercules d'une même plante et entre les plantes d'une même variété.

2) Placer un disque de papier tampon dans l'un des flacons en plastique à fond plat fournis dans le kit E, déposer les 100 mg de chair du tubercule, ajouter 1 ml d'eau à l'aide d'une pipette, insérer le papier picrate fixé sur une bande plastique et fermer le flacon avec le couvercle à vis (figure 3). **Le papier picrate ne doit pas entrer en contact avec le liquide contenu dans le flacon (figure 4).** Le flacon doit être préalablement annoté avec le nom (et/ou le code) de la variété évaluée (figure 5). Le tampon utilisé (tampon phosphate) permet de maintenir le pH entre 6 et 8 pour que la réaction enzymatique de dégradation des glycosides cyanogènes soit optimale.

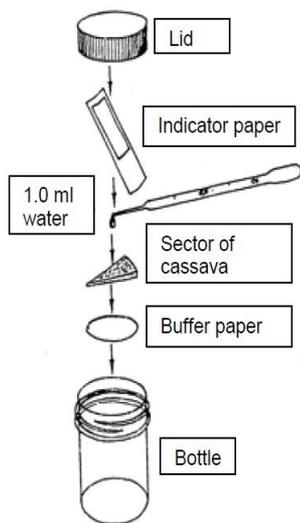


Figure 3 : les étapes schématisées du test au papier picrate pour la détermination de la teneur en cyanure des échantillons de tubercules frais de manioc. D'après Bradbury et al., (1999).

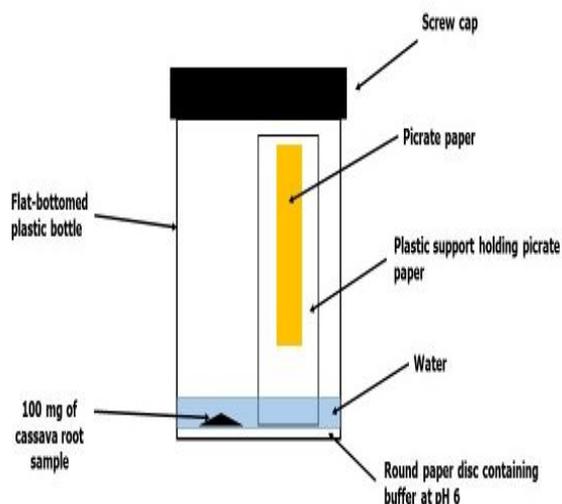


Figure 4 : sens de placement du papier picrate dans le flacon en plastique à fond plat. D'après Imakumbili (2019).



Figure 5 : flacon en plastique à fond plat contenant des morceaux de chair du tubercule, du papier tampon et du papier picrate.

- 3) Effectuer un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série d'expériences (une série d'expériences peut comprendre une ou plusieurs variétés évaluées).
 - a) Pour le contrôle négatif, préparer un autre échantillon comme sur la figure 3 (voir page précédente), mais sans intégrer d'échantillon de chair de manioc.
 - b) Pour le contrôle positif, suivre la figure 6. Placer un disque de papier tampon/enzyme dans le flacon. Ajouter un disque de papier standard rose, puis 1,0 ml d'eau à l'aide d'une pipette, ainsi que le papier picrate indicateur jaune. Le papier standard rose contient de la linamarine (glycoside cyanogène) dont la concentration en cyanure est connue (environ 50 ppm).

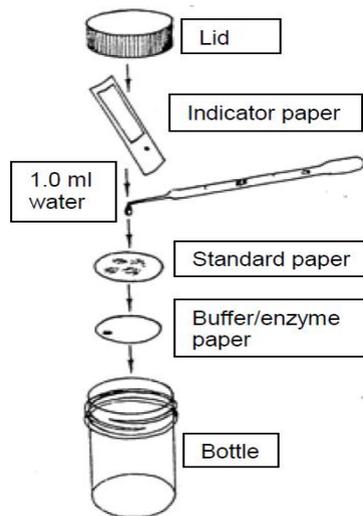


Figure 6 : préparation du contrôle positif du test au papier picrate pour la détermination de la teneur en cyanure des échantillons de tubercules frais de manioc. D'après Bradbury et al., (1999).

4) Conserver les petits flacons en plastique à fond plat à température ambiante pendant 16 à 24 heures. La conservation doit être réalisée à l'abri de la lumière, par exemple, dans un placard (figure 7).

La durée de conservation correspond au temps nécessaire, à température ambiante, pour que l'hydrolyse enzymatique dégrade complètement les glycosides cyanogènes en cyanure mesurable par le papier picrate.

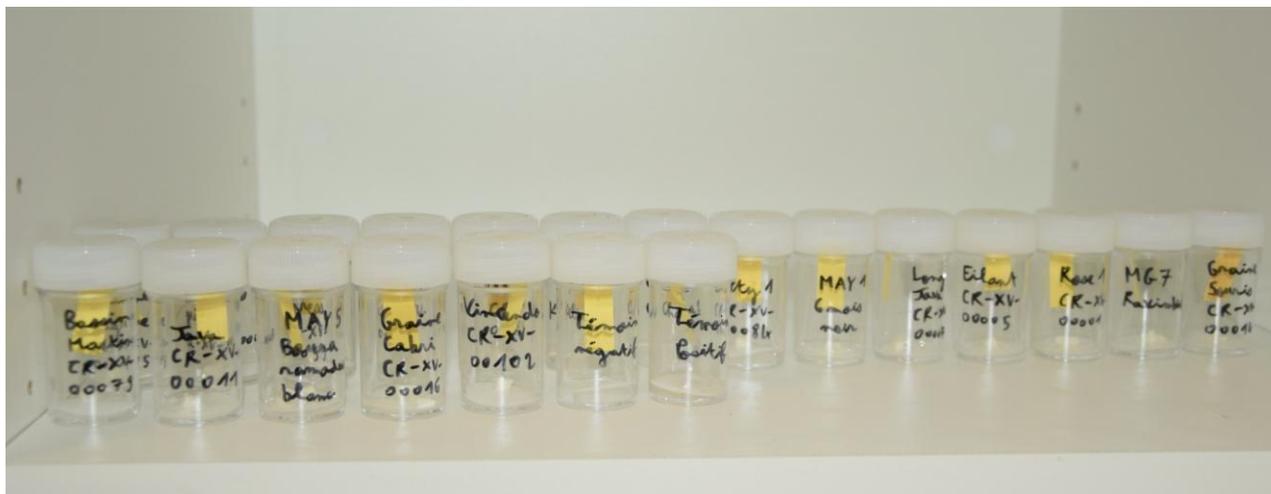


Figure 7 : conservation des flacons en plastique à fond plat contenant les échantillons de tubercules de manioc.

5) Ouvrir les flacons en plastique à fond plat et faire correspondre la couleur des papiers picrates avec celle du nuancier de couleurs fourni.

6) Lire sur le nuancier la teneur totale en cyanure des échantillons de tubercule frais (figure 8). Vérifier que le témoin négatif donne une couleur équivalente à 0 ppm de cyanure et que le témoin positif donne une couleur équivalente à environ 50 ppm. Sinon refaire le test.

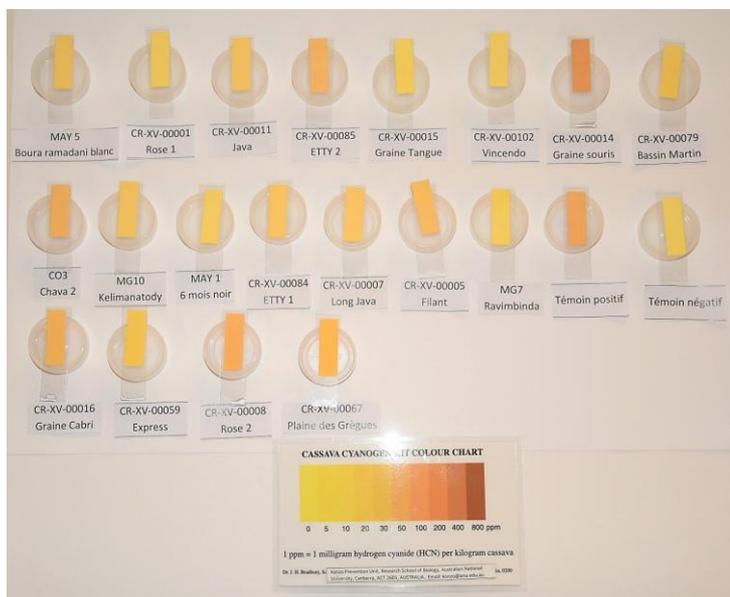


Figure 8 : lecture au papier picrate d'échantillons de tubercules frais de manioc.

7) Catégoriser la variété suivant le résultat obtenu :

- si la teneur en cyanure est inférieure à 50 ppm, la variété est considérée comme douce (norme 238-2003 du Codex Alimentarius), elle peut être consommée sans préparation préalable c'est-à-dire « crue » (Ndusi et Chidiebere, 2018)
- si la teneur en cyanure est supérieure à 50 ppm, la variété est considérée comme amère (norme 300-2010 du Codex Alimentarius), elle nécessite un processus de transformation et de détoxification avant d'être consommée (Ndusi et Chidiebere, 2018)

Si vous disposez d'un spectrophotomètre

- 8) Retirer soigneusement la feuille de plastique qui sert de support au papier picrate.
- 9) Placer le papier picrate dans un tube à essai ou dans un bécher de 25 à 50 ml, puis y ajouter 5 ml d'eau avec une pipette. Laisser le tube à essai ou le bécher à température ambiante pendant environ 30 minutes en remuant doucement de temps en temps (figure 9).



Figure 9 : préparation des solutions pour l'utilisation du spectrophotomètre (élution dans l'eau de la couleur des papiers picrates).

Si vous disposez d'un spectrophotomètre

10) Prélever 1 ml de solution à l'aide d'une pipette et le transférer dans une cuve spectrophotométrique (figure 10).

11) Mesurer l'absorbance de la solution à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (figure 11).

12) Calculer la teneur totale en cyanure (en ppm) à l'aide de l'équation de Bradbury et al., (1999) :

Teneur totale en cyanure (en ppm) = $396 \times (\text{absorbance de l'échantillon} - \text{absorbance du témoin négatif})$

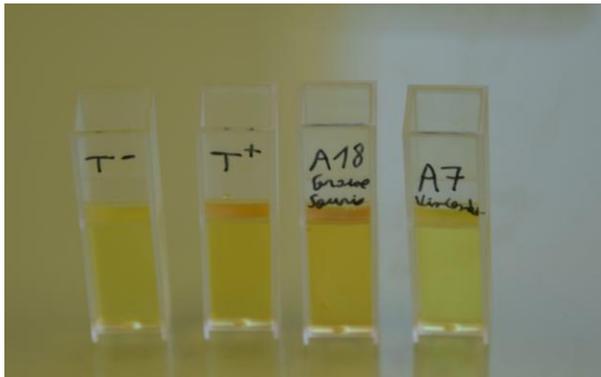


Figure 10 : exemples de cuves spectrophotométriques contenant des solutions issues de l'élué des papiers picrates dans l'eau.



Figure 11 : spectrophotomètre.

Exemple d'application

1) Lecture au papier picrate

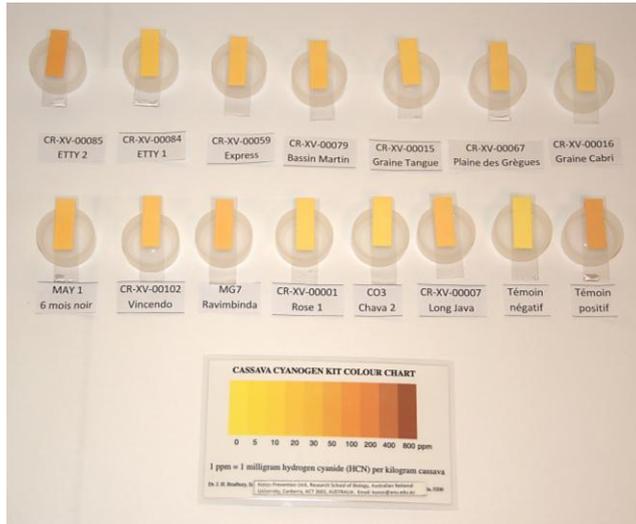


Figure 12 : lecture au papier picrate d'échantillons de tubercules frais de manioc.

La variété de manioc ETTY 2 CR-XV-00085 apparaît avoir une teneur en cyanure de ses tubercules au moins égale à 50 ppm. Elle ne semble pas douce. Les autres variétés de manioc semblent douces car la teneur en cyanure de leurs tubercules est inférieure à 50 ppm.

La lecture au spectrophotomètre affinera les résultats et statuera sur le statut amère ou non de la variété ETTY 2 CR-XV-00085.

Interprétation des couleurs des papiers picrates (comparaison de la couleur des papiers picrates à celle du nuancier de couleurs) :

Témoin positif : 50 ppm, Témoin négatif = 0 ppm, CR-XV-00084 Long Java : 20 ppm, CO3 Chava 2 : 5 ppm, CR-XV-00001 Rose 1 : 5 ppm, MG7 Ravimbinda : 30 ppm, CR-XV-00102 Vincenzo : 20 ppm, MAY 1 6 mois noir : 20 ppm, CR-XV-00016 Graine Cabri : 10 ppm, CR-XV-00067 Plaine des Grègues : 20 ppm, CR-XV-00015 Graine Tangué = 20 ppm, CR-XV-00079 Bassin Martin : 20 ppm, CR-XV-00059 Express : 20 ppm, CR-XV-00084 ETTY 1 : 20 ppm, CR-XV-00085 ETTY 2 = 50 ppm.

Exemple d'application

2) Lecture au spectrophotomètre

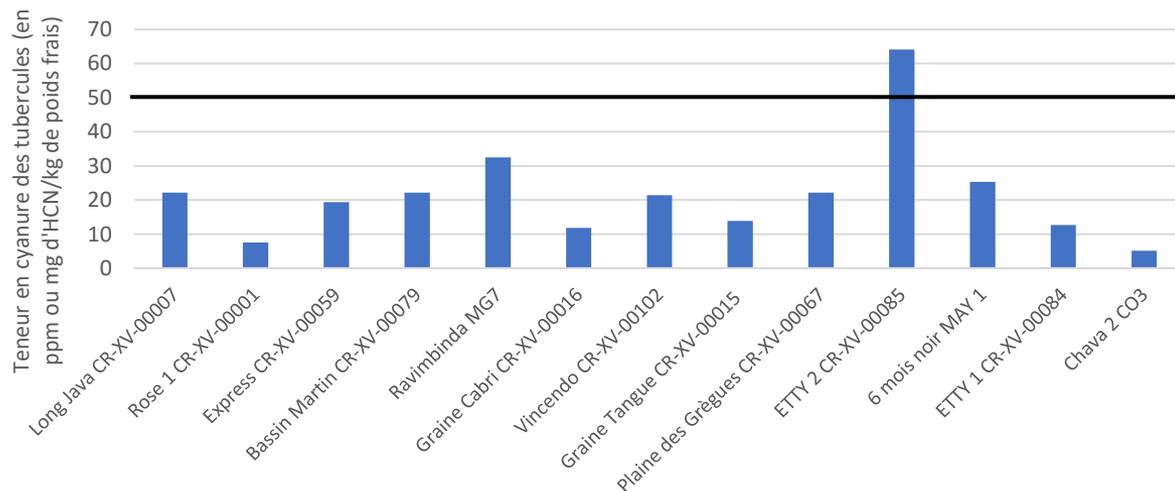


Figure 13 : teneur en cyanure d'échantillons de tubercules frais de manioc, mesurée au spectrophotomètre.

La variété ETTY 2 CR-XV-00085 présente une teneur en cyanure de ses tubercules supérieure à 50 ppm (figure 13). Ce résultat affine celui de la lecture au papier picrate. La variété ETTY 2 CR-XV-00085 peut donc être considérée comme amère.

Les autres variétés ont une teneur en cyanure de leurs tubercules inférieure à 50 ppm (figure 13). Ce résultat est en accord avec la lecture au papier picrate. Ces variétés peuvent être donc considérées comme douces.

Bibliographie

Bradbury, M.G., Egan, S.V., Bradbury J.H., 1999. Picrate paper kits for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(4), 593-601

Imakumbili, M.L., 2019. Détermination des niveaux de cyanure d'hydrogène total dans les racines de manioc fraîches à l'aide de la méthode du papier picrate. Consulté le: 8 mai 2025. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.protocols.io/view/determination-of-total-hydrogen-cyanide-levels-in-8epv563w5g1b/v3>

Jackson, J., Chiwona-Karltun, L., Gordon, A., 2020. Food safety and quality considerations for cassava, a major staple containing a natural toxicant. Consulté le: 23 mai 2025. [En ligne]. Disponible sur : https://pub.epsilon.slu.se/22169/1/jackson_j_et_al_210129.pdf

Ndubuisi, N.D., Chidiebere, A.C.U., 2018. Cyanide in Cassava: A Review. *International Journal of Genomics and Data Mining*, 2(1), 1-10