

# DETERMINATION PAR UNE METHODE COLORIMETRIQUE DE LA TENEUR EN ACIDE CYANHYDRIQUE DU FOURRAGE DE MANIOC ENSILE

JEAN NOËL KEITA<sup>1</sup>, BOUBACAR MARIKO<sup>2</sup>, KONIMBA BENGALY<sup>2</sup>,  
SOUNKALO TRAORE<sup>2</sup>, NAH TRAORE<sup>3</sup>, HAROUNA MAIGA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Université de Ségou, Institut Universitaire de Formation Professionnelle (IUFPP), Département Sciences et Techniques, BP 24/Tél (00223) 21 32 02 30, Mali

<sup>2</sup>Université de Ségou, Faculté d'Agronomie et de Médecine Animale (FAMA), Mali

<sup>3</sup>Université des Sciences, des Sciences et Techniques de Bamako, Faculté des Sciences et Techniques, Département de chimie, Mali

<sup>4</sup>Department of Agriculture and Natural Resources University of Minnesota, Crookston Campus 100 C UTOC 2900, University Ave Crookston, MN 56716 - USA

Auteur correspondant : Jean Noël Keita, Université de Ségou, E-mail : [jeannoelkeita@gmail.com](mailto:jeannoelkeita@gmail.com) / (00223) 21 32 02 30

## Résumé

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz), plante originaire de l'Amazonie, est aujourd'hui cultivé dans l'ensemble des régions tropicales pour ses racines charnues riches en amidon. Après la récolte du tubercule, la partie aérienne de la plante (tige et feuilles) est un sous-produit, sous-exploité. La valorisation de cette ressource fourragère dans l'alimentation du bétail est une alternative au déficit fourrager chronique auquel sont confrontés les ruminants dans la région de Ségou. En zone semi-aride, les avantages de ce mode d'alimentation résident dans la forte valeur azotée et le fort équilibre saisonnier de leur production. Toutefois, la présence de deux glucosides cyanogéniques qui libèrent par hydrolyse enzymatique, l'acide cyanhydrique (HCN), limite la promotion de ce fourrage. Nous avons, grâce à l'utilisation d'une méthode d'analyse colorimétrique, trouvé une teneur  $\leq 400$  mg/Kg en HCN dans les feuilles apicales fraîches broyées et une teneur abaissée de  $\leq 5$  mg/Kg dans le même fourrage ensilé. Ces résultats, traduisent l'abaissement par l'ensilage en dose inoffensive des composés cyanés du fourrage de manioc.

**Mots clés :** abaissement, teneur, acide cyanhydrique, ensilage, feuilles, manioc.

## Abstract:

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), a plant native to the Amazon, is now grown throughout the tropics for its fleshy roots rich in starch. After harvesting the tuber, the aerial part of the plant (stem and leaves) is a by-product, under-exploited. The valorization of this fodder resource in the cattle feed is an alternative to the chronic forage deficit faced by ruminants in the region of Ségou. In semi-arid zones, the advantages of this mode of feeding reside in the strong nitrogen value and the strong seasonal balance of their production. However, the presence of two cyanogenic glucosides which release by enzymatic hydrolysis, hydrocyanic acid (HCN), limits the promotion of this forage. Using a colorimetric assay method, we found a  $\leq 400$  mg / kg HCN content in chopped fresh apical leaves and a reduced  $\leq 5$  mg / kg content in the same silage forage. These results reflect the reduction by silage in a harmless dose of cyanide compounds in cassava forage.

**Key words:** lowering, content, hydrocyanic acid, silage, leaves, manioc

## 1. Introduction

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiacées), plante originaire de l'Amazonie, est aujourd'hui cultivé dans l'ensemble des régions tropicales. Cultivé pour ses racines charnues riches en amidon, le manioc constitue la base de l'alimentation de près d'un milliard de personnes (Cooke et De La Cruz 1982). Le tubercule est pauvre en protéines (1,5 %) mais riche en amidon (84 %). A l'inverse, les feuilles contiennent 7 % de protéines et 10 % de glucides (McMahon et al. 2005). Environ 60% du manioc produit est destiné à la consommation humaine, et un tiers à l'alimentation animale (McMahon et al. 2005). Le reste est transformé en produits secondaires comme l'amidon ou l'éthanol (McMahon et al. 2005 ; Nartey, 1968). L'intérêt du manioc réside dans le fait qu'il s'accommode aux conditions climatiques difficiles et aux sols médiocres, offrant ainsi une large tolérance dans le choix de la période de récolte et permettant de rendre le fourrage disponible au moment des besoins, ce qui a comme corollaire le développement de plusieurs types de produits. Environ 10 tonnes de feuillage sec de manioc sont produites par hectare. Le bétail est très friand des feuilles de manioc, mais un excès de celles-ci entraîne une légère torpeur (Kerharo et Bouquet 1950, Nartey, 1968 ; Monique et al.1982). Malgré ses avantages, le fourrage de manioc présente un inconvénient majeur qui limite son utilisation en alimentation animale : une toxicité liée à la présence de deux glucosides cyanogénétiques (Kerharo et Bouquet 1950, Nartey, 1968 ; Monique et al.1982). Ces glucosides en eux-mêmes ne sont pas toxiques, mais lorsqu'ils sont hydrolysés par une enzyme, la glucosidase, également présente dans la plante, mais dans un autre compartiment cellulaire, de l'acide cyanhydrique (HCN) est libéré. Ceci ne se produit que lorsque l'enzyme et son substrat se rencontrent, lorsque la structure de la cellule est rompue, par exemple suite à l'attaque d'un herbivore tel l'homme ou d'un organisme pathogène (McMahon et al. 2005 ; Kerharo et Bouquet 1950, Nartey, 1968 ; Monique et al.1982). Nous avons, grâce à l'utilisation d'une méthode d'analyse colorimétrique, trouvé une teneur en HCN  $\leq 800$  mg/Kg dans les feuilles apicales fraîches broyées. Ce travail a pour but d'évaluer l'effet de l'ensilage sur cette teneur. Dans l'optique de lever cette contrainte, un procédé de transformation du fourrage de manioc a été testé et a apporté une amélioration de la qualité toxicologique ( $\leq 20$  mg/Kg). Au Mali, les expériences sur l'utilisation du fourrage de manioc dans l'alimentation des ruminants sont rares, d'où l'intérêt de ce travail pour la recherche et le développement.

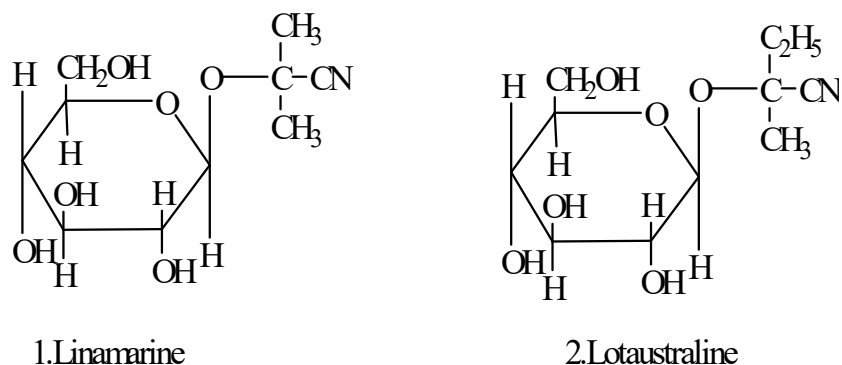
## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Les glucosides cyanogéniques du manioc

#### 2.1.1 L'acide cyanhydrique et la toxicité du manioc

Les tissus de manioc ont la propriété d'émettre, dans certaines conditions, de l'acide cyanhydrique (HCN), cette propriété, appelée cyanogénèse, est très fréquente dans le règne végétal, et a été recensée chez plus de 1000 espèces appartenant à 90 familles (De Brujn, 19716). Le principe toxique essentiel qui existe en quantités variables dans toutes les parties de la plante de manioc est un composé chimique appelé linamarine. Ce composé coexiste avec son homologue méthylique appelé lotaustraline (Kerharo et Bouquet 1950, Nartey, 1968 ; Monique et al.1982) dans le rapport 93/7, ce qui montre que la linamarine est de loin le composé cyanogénique le plus important. La linamarine et la lotaustraline, comme l'ensemble des glucosides cyanogéniques possèdent un goût amer. Il existe d'autres composés dont l'IAG (Isopropyl- $\beta$ -D-Apiofuranosyl-(1-6) - $\beta$ -D-Glucopyranoside) qui contribuent davantage à l'amertume du manioc (Diallo et al.2003). . La fonction de ces glucosides cyanogéniques dans

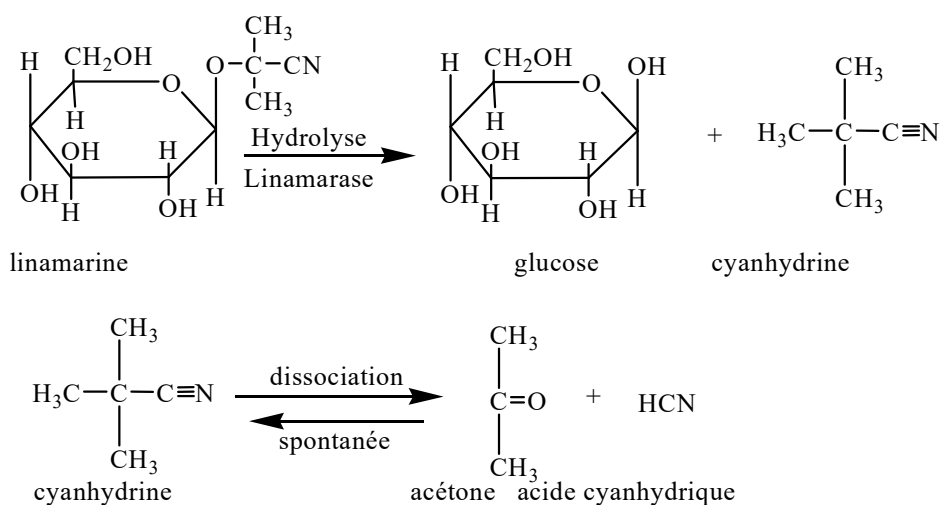
la plante a fait l'objet de diverses hypothèses simples produits d'excrétion, rôle de protection de la plante, réserve de carbone et d'azote pour les biosynthèses organiques. On s'accorde aujourd'hui à penser que seul le rôle de protection pourrait être effectif. La libération d'acide cyanhydrique lors de la destruction des tissus de la plante pourrait conférer à celle-ci une résistance à l'attaque de prédateurs, de parasites ou de microorganismes, cependant, un tel rôle n'a pas été clairement démontré (Hruska, 1988).



**Figure 1 :** Structures chimiques de la linamarine et de la lotaustraline

La linamarine est transformée en acide cyanhydrique lorsqu'il entre en contact avec la linamarase, une enzyme qui est libérée quand les cellules des racines de manioc se rompent. La linamarase est une enzyme endogène qui a son optimum d'activité à pH 5,5 - 6. Elle est détruite à 72°C (Bourdoux et al.1980). La décomposition de la linamarine se déroule en deux étapes (Conn, 1968):

- hydrolyse enzymatique des glucosides cyanogéniques avec formation des cyanohydrines (acétone pour la linamarine, méthyl-éthyl acétone pour la lotaustraline).
- dissociation spontanée de la cyanohydrine. Cette dissociation peut cependant être accélérée par une enzyme, une hydroxynitrile lyase présente également dans le manioc. L'acide cyanhydrique est un composé volatil. Il s'évapore rapidement dans l'air à des températures supérieures à 28°C et se dissout facilement dans l'eau. Il peut aisément être perdu durant le transport, l'entreposage et l'analyse des échantillons (Delange et al.1982).



**Figure 2 :** Schéma de dégradation de la linamarine (Conn, 1968)

### 2.1.2 Répartition des glucosides cyanogéniques dans le manioc

La présence des glucosides cyanogéniques a été observée dans tous les clones du manioc, que les variétés soient réputées douces ou amères. Chez les variétés amères, dans les racines comme dans le reste de la plante, ces composés sont présents en concentrations élevées. Il s'agit de deux glucosides cyanogéniques, la linamarine (très majoritaire) et la lotaustraline. Ces glucosides en eux-mêmes ne sont pas toxiques, mais lorsqu'ils sont hydrolysés par une enzyme, la glucosidase, également présente dans la plante, mais dans un autre compartiment cellulaire, de l'acide cyanhydrique (HCN) est libéré (McMahon et Sayre, 2005 ; Nartey, 1968). Si le facteur génétique joue un rôle capital sur les teneurs en glucosides cyanogéniques, celles-ci peuvent varier de façon notable avec les conditions de milieu: richesse du sol, apport en matière organique, potasse, azote, luminosité, conditions climatiques, âge de la plante. Des variétés inoffensives au Bénin qui se sont révélées toxiques sur les sols forestiers du Nigéria, ou inversement des types "amers" provenant de la Jamaïque, devenus sans danger au Costa-Rica (Silvestre et al.1983).

### 2.2 Matériels et réactifs

Pour arriver aux résultats que nous présentons, nous avons utilisé les appareils et réactifs suivants : Tampon PH 8, Congélateur, Balance analytique, Bouteille plastique avec bouchon à vis, Papier picrate jaune, diagramme coloré en ppm indiquant la teneur en mg/Kg de HCN, papier linamarine, pipette 1 mL et ciseaux, mortier et pilon.

### 2.3 Matériel végétal

Le fourrage (tiges plus feuilles) de manioc préalablement haché manuellement, a été en partie séché sous-abris et une autre partie ensilée. Le matériel a été ensilé dans des sacs en polyéthylène et conservé pendant 8 à 10 mois. Le matériel végétal est donc constitué de :

- Échantillon 1 : jeunes feuilles fraîches de manioc
- Échantillon 2 : feuilles basales de manioc
- Échantillon 3 : feuilles ensilées de manioc pendant 8 à 10 mois
- Échantillon 4 : blanc

### 2.4 Ensilage

Les pousses apicales et les feuilles sont manuellement découpées à la hache en petits morceaux (Figure 3). Elles sont ensuite mélangées avec du son de riz suivant le ratio de 4 parties de fourrage de pour 1 partie de son de riz ( $\Gamma$ ).

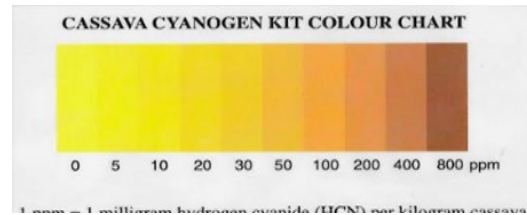
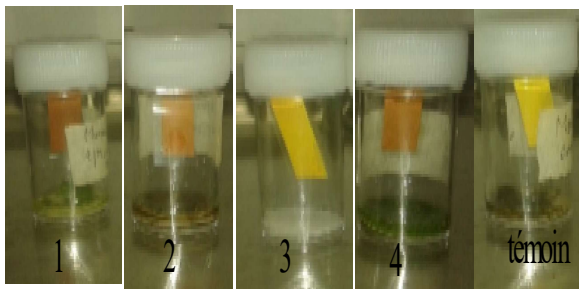


Figure 3 : Hachage manuel du fourrage



Figure 4 : Ensilage du fourrage

Le mélange est ensilé dans des sacs en plastique ou des fosses de 1,5m de profondeur tapissée au fond et sur les côtés de feuilles de plastique, puis recouvert. Le mélange doit être complètement compacté afin de permettre une fermentation aérobie.



**Figure 5 :** Echantillons 1, 2, 3, 4 et le blanc. **Figure 6 :** Diagramme en mg/Kg de HCN

## 2.5 Mode opératoire

Pour déterminer le taux de cyanure dans les feuilles de manioc, nous avons utilisé une méthode colorimétrique, peu onéreuse qui a été mise au point en Australie (Bradbury et al.1999 ; Egan et al.1998).

Les feuilles de manioc contiennent des glucosides cyanogéniques et une enzyme qui hydrolyse ces composés en acide cyanhydrique. L'acide cyanhydrique libéré est entraîné par la vapeur d'eau ; cette hydrolyse enzymatique est une réaction rapide, d'où la nécessité de suivre les étapes d'analyses selon principe suivant (Bradbury et al.1999 ; Egan et al.1998) :

- découper les feuilles en petits morceaux à l'aide de ciseaux puis les piler dans un mortier ;
- peser 100 mg de broyat à l'aide d'une balance analytique ;
- placer un disque de papier à filtre rond imbibé d'une solution tampon à pH 8 et 100 mg de broyat dans une bouteille en plastique, puis 1 mL d'eau distillée ;
- ajouter du papier picrate jaune attaché à une bande en plastique, sans toucher le liquide et fermer la bouteille avec un bouchon (figure 5) ;
- préparer un autre échantillon comme ci-dessus, mais sans feuilles, pour servir de blanc ;
- garder les bouteilles dans une enceinte sous une température ambiante de 20-35°C pendant 16-24 heures ;
- ouvrir les bouteilles et confronter la couleur du papier avec celle du diagramme coloré fourni ;
- à partir du diagramme coloré (figure 6), lire la quantité totale de HCN en mg/Kg dans les feuilles et vérifier que le blanc correspond au zéro.

## 3. Résultats

Les résultats obtenus (tableau 1), confirment l'effet de l'ensilage sur de la teneur en acide cyanhydrique du fourrage de manioc.

Suivant les teneurs en acide cyanhydrique du fourrage, on peut proposer l'échelle suivante de toxicité des différents échantillons (Kobawila et al.2005, Kavana et al.2005).

**Tableau 1** : Teneur en mg/Kg de HCN de différents fourrages de manioc et toxicité relative.

Echantillons de manioc	HCN (mg/Kg)	Indication sur la toxicité
Jeunes feuilles fraîches	800	Très forte (très toxique)
Feuilles basales fraîches	400	Forte (toxique)
Jeunes feuilles séchées	50	Faible (modérément toxique)
Fourrage ensilé	20	Très faible (inoffensive)
Témoin	0	

#### 4. Discussion

La présente étude ouvre les possibilités de valorisation du fourrage de manioc détoxifié par ensilage pour la production de viande. La toxicité potentielle du cyanure et l'altération du goût résultant de la forte teneur en tanin limitent l'utilisation des feuilles de manioc. Pour surmonter ces problèmes, des chercheurs ont montré qu'en ensilant les feuilles de manioc, la teneur en cyanure était ramenée à un taux négligeable (inoffensif) (Kobawila et al.2005, Kavana et al.2005) et l'ajout d'une petite quantité de son de riz ou de mil permettait d'obtenir un ensilage de bonne qualité. Des études ont démontré que la concentration maximale de HCN dans les aliments du bétail est de 100 mg/Kg de matière sèche (Kobawila et al.2005 ; Gómez, 1991). Nous avons, grâce à l'utilisation d'une méthode d'analyse colorimétrique, trouvé une teneur  $\leq 800$  mg/Kg en HCN (forte coloration au papier micro-sodé) dans les feuilles apicales fraîches broyées (fig.5, échantillon 1). Le manioc ensilé a permis de diminuer la teneur en HCN à des niveaux de tolérance acceptables ( $C \leq 20$  mg/Kg) (fig.5, échantillon 3). Ces résultats confirment que le fourrage de manioc ensilé avec le bon potentiel de protéines tannées, peut être intégré les rations alimentaires de ruminants.

#### 5. Conclusion

Au Mali, les fermiers sont confrontés à une offre insuffisante et aux coûts élevés des intrants alimentaires dans leur activité. Ce constat commande d'envisager des solutions alternatives, remplacer partiellement ou totalement les intrants alimentaires classiques, par d'autres sources disponibles et moins chers. Sur la base des résultats chimiques obtenus, le fourrage de manioc peut être incorporé dans l'alimentation animale sans risque et en grande partie en raison de sa haute disponibilité. Il convient de préciser que la mise à la disposition aux fermiers d'un kit pareil permettant la détermination simple de la teneur en HCN peut faciliter cette innovation au Mali. Dans le contexte Malien, l'optimisation de l'élevage passe par la production sur place d'aliments complémentaires pour le bétail. Le manioc pourrait apporter un élément de solution à ce problème.

## Références

- Bolhuis, G.G. (1954) The Toxicity of Cassava Roots. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 2, 176-185.
- Bourdoux, M. Hanson, A and Ermans, A.M. (1980). Cassava toxicity: the role of linamarin. *Ottawa Ont. IDRC*.
- Bradbury, M G Egan, S V and HBradbury, J.(1999). Picrate paper kits for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. *Sci Food Agric (79):593–601*.
- Conn, E. E. (1969). Cyanogenic glycosides. 1. *AgriC. Food Chem.*, (15), 519-526
- Cooke, R. D., De La Cruz. E. (1982). An evaluation of enzymic and autolytic assays for cyanide in cassava (*Manihot esculenta Grant*). *J. Sei. Food Agric.*, 33, 1001-1009.
- De Bruijn, G. H. (1971) A study of the cyanogenic character of cassava (*Manihot esculenta Grant*). *Mededelingen Landhouwhogeschool. Wageningen. Nederland.* 71-13. pp. 1-140.
- Delange F.; ITEKE F.B. AND ERMANS A.M. (1982). Nutritional factors involved in the goitrogenic action of Cassava. *Ottawa, out, IDRC.* 100 p.
- Demarquilly C., 1986. L'ensilage et l'évolution récente des conservateurs. *Bulletin Technique du CRZV de Theix, N°63, 5-12.*
- Diallo Y, Gueye M T, Sakho M (2), Darboux P G, u Kane A, Barthelemy J P Lognay G. (2013) .Importance nutritionnelle du manioc et perspectives pour l'alimentation de base au Sénégal (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 17(4), 634-643.
- Egan, S.V., Yeoh, H.H. and Bradbury, J.H. (1998) Simple picrate paper kit for determination of the cyanogenic potential of cassava flour. *J. Sci. Food Agric.* 76, 39-48.
- Gómez, G. G. (1991). Use of cassava products in pigs feeding. *Pigs News and Information* 12:387-390.
- Hruska, A. J. (1988) Cyanogenic glucosides as defense compounds - a review of the evidence. *J. Chem. Ecol* (14), 2213-2217.
- Kavana, P. Y., Mtunda, K., Abass, A. and Rweyendera, V. (2005). Promotion of cassava leaf silage utilization for smallholder dairy production in eastern coast of Tanzania. *Livestock Research for Rural Development* 17 (4).
- Kerharo (J.), Bouquet (A.) - (1950) - *Plantes médicinales et toxiques de la Côte d'Ivoire et de la Haute-Volta.* Vigot Ed.
- Khieu B, Chhay T, Ogle RB, Preston TR. (2003). Research on the use of cassava leaves for livestock feeding in Cambodia. *Livestock Research for Rural Development* 15 (7)
- Kobawila S.C. et al., 2005. Reduction of the cyanide content during fermentation of cassava roots and leaves to produce bikedi and ntoba mbodi, two food products from Congo. *Afr. J. Biotechnol.*, 4(7), 689-696.

Monique Larpent-Gourgaud et Jean-Jacques Sanglier ; 1992: Biotechnologies principes et methods. 425p.

McMahon J.M., White W.L.B. & Sayre R.T. 2005 – Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Experimental Botany* 46: 731-741.

Nartey, F. (1978). Cassava cyanogenesis ultrastructure and seed germination. In Cassava copenhagen muksgaard. Eds.R.Denis, F.Walter New york.pp 234.

Nartey. F. (1968).Studies on *cassava Manihot Utilissima pohl-1*. Cyanogenesis the biosynthesis of linamarin and lotaustralin in esolated seedlings. *Phytochemistry*. 7. 1307-1312.

Silvestre P., Arraudeau M. Le Manioc. GP Maisonneuve et Larose Ed. Paris, 1983, p. 254.