
**CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET
STABILISATION DES HYDROLYSATS ISSUS DE
LA FERMENTATION DES COTYLEDONS DE
PARKIA BIGLOBOSA (JACQ) BENTH**



Je dédie ce mémoire à:

Baobab des " **Sarénes** " mes ancêtres paternels et au **Rônier** des " **Fatiiks** " mes ancêtres maternels

Mon **PERE** et ma **MERE** : Que le Seigneur tout Puissant et Miséricordieux vous donne gloire et longévité.

Ma petite **Clémence** et sa mère **Marie Ndène** : Votre affection et votre compréhension nous ont beaucoup réconforté dans ce travail.

Mes amis du **Trio** : **Philippe, Damien, Suzanne, Yvette, Véronique D. et Véronique F.**
Restons toujours solidaires et le Seigneur nous aidera dans nos différentes entreprises.

REMERCIEMENTS

Je remercie de tout cœur à:

Docteur Lat Souk Tounkara: De par vos conseils, votre intelligence et votre amour du métier, vous nous avez beaucoup aidé à réaliser ce travail .Merci de tous les efforts que vous avez fournis pour nous et de nous avoir accueilli dans votre **laboratoire de biotechnologie**.

Professeur Abdoulaye Samb: nous ne vous remercierons jamais assez, vous qui nous avez transmis votre savoir. Soyez confiant de notre profonde reconnaissance.

Amadou Tidiane Guiro: DG de l'I.T.A., **Ababacar Ndoye : DRD** de l'I.T.A. et **Dr Amadou Kane** chef des allocataires: Merci de nous avoir accepté dans votre institut et de nous mettre dans de bonnes conditions.

Dr Paul Marie Ngom: Vous êtes alpha et oméga de ce travail, votre esprit de fraternité et votre humilité ont facilité notre intégration au niveau de l'I.T.A. Que la **Sainte Vierge Marie** veille sur vous.

Dr Ndir : Votre apport intellectuel et vos conseils nous ont beaucoup aidé dans ce travail. Que Dieu vous aide et soit votre Berger de tous les jours.

Madame Gning : De par votre affection maternelle et de par votre compréhension de la vie communautaire, vous n'avez jamais cessé de nous donner des conseils et de nous aider. Que le Seigneur clément vous sanctifie et vous donne la grâce.

Mes amis du laboratoire de biotechnologie: Astou, Cheikh, Mathias, Matar, Khady, Dieynaba, Fatou Moussa, Papis et Yaya; votre esprit grégaire et votre disponibilité ont été le fondement de notre intégration dans le laboratoire .Que la paix du Seigneur soit avec vous.

Aliou Faye: L'homme fidèle en amitié et en parole, seul Dieu pourra estimer le degré de nos remerciements envers toi. Béni sois tu.

L'ensemble du personnel de l'I.T.A. particulièrement à Anta Diallo, Nabou Fall, Maguette, Ousmane, Pape Demba, Cheikh Ndiaye, Mamadou Ly, Ndeye Fatou Ndiaye, Mamadou Sadj, Omar Diémé, Souleymane Diack, Babacar Beye, Dr Mor Talla Gueye.

La famille Diouf de Pikine: Depuis plus d'une décennie vous avez cherché notre plaisir et à nous mettre dans très bonnes conditions. Que Dieu vous accorde la grâce et la paix.

Mes frères et sœurs : Votre soutien moral et financier nous a beaucoup réconforté dans ce travail. Que le fruit de ce travail vous serve à quelque chose.

Mes amis de Ngohé Ndofongor: Christophe, Seck, Edmond, Pape Alphonse, Jacques, Célestin, Seynabou, Elisabeth, Paul, Jean Baptiste(1et2), Ngor Mack, Marthes, Marie Coumba, Moundor, Diène, EL Hadji, Louis , Ousmane, Philomène, Pascal, Hélène et Abou Deb avec son fils petit André. Ensemble travaillons avec beaucoup de courage pour le développement du village.

LISTE DES ABREVIATIONS

AOAC: Association of Official Analytical Chemist

°B: degré Brix

°C: degré Celsius

cm: centimètre

DH: Degré d'Hydrolyse

H: Heure

g: gramme

kg: kilogramme

Kgy: kilogray

L: Litre

m²: mètre carré

m³: mètre cube

ml: millilitre

mm: millimètre

mn: minute

s: seconde

TS: Tryptone Sel

tr / mn: tour par minute

ufc/g: unité de microorganismes formant colonie par gramme

YGLA: Yeast Glucose Lemoo Agar

TABLE DES MATIERES

PRESENTATION DE L'INSTITUT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE (ITA).....	2
INSTITUT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE(I.T.A.).....	2
1: Historique de l'entreprise.....	2
2: Activités annuelles.....	3
3: Mission et objectif.....	3
UNITE DE BIOTECHNOLOGIE / I.T.A.....	4
Domaine de compétence.....	4
Champs d'application.....	4
INTRODUCTION GENERALE.....	6
ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES.....	9
I: LA PLANTE.....	9
I-1 Synonymes.....	9
I-2 Noms vernaculaires.....	9
I-3 :Historique.....	10
I-4: Milieu écologique et botanique.....	11
I-5: La composition chimique des graines crues de <i>Parkia biglobosa</i>	11
II: FABRICATION TRADITIONNELLE DU NETETU.....	12
III: LES PARAMETRES OPTIMAUX POUR LES MICROORGANISMES RESPONSABLES DE LA FERMENTATION DES COTYLEDONS DE <i>PARKIA BIGLOBOSA</i>	13
IV: LES COMPOSES CHIMIQUES DU NETETU.....	13
V: LES MICROORGANISMES FAVORISANT LA FERMENTATION TRADITIONNELLE ET LES MICROORGANISMES D'ACCOMPAGNEMENT.....	14
V-1: Evolution du pH et de l'acidité titrable.....	15
V-2: Processus exothermique.....	15
VI: FERMENTATION CONTROLEE DES COTYLEDONS DE <i>PARKIA BIGLOBOSA</i> EN UTILISANT LE STARTER DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	15
VI -1: le décorticage.....	16
VI- 2 :Le trempage.....	16
VI -3 : la cuisson.....	16
VI -4: l'inoculation.....	16
VI -5: La fermentation.....	16

VI -6: Le salage et le séchage.....	16
VII: LES ENZYMES BACTERIENNES PRODUCTRICES D'AROMES.....	17
VII -1 : Les Glycosidases.....	17
VII-1-1: β- Glycosidases.....	17
VII- 1-2: β-Thioglycosidase.....	18
VII -2: Lipases.....	18
VII -2-1: Hydrolyse d'ester du glycérol.....	19
VII – 3 : Les Protéases.....	19
VIII: ACIDES AMINES CONTENUS DANS LES HYDROLYSATS DU NETETU ...	20
IX: LES AROMES DE NETETU.....	21
IX -1: Les acides.....	21
IX- 2: Les alcools.....	21
IX- 3 : Les aldéhydes.....	21
IX- 4: Les Pyrazines.....	22
IX- 5 : Le phénol.....	22
IX- 6 : Les composés soufrés.....	22
X: PREPARATION DES HYDROLYSATS DES PROTEINES.....	22
X- 1: Suivi de l'hydrolyse.....	23
X- 2 :Synthèse de plastéines.....	24
CONCLUSION.....	27
MATERIEL ET METHODES.....	29
CHAPITRE I : MATERIEL BIOLOGIQUE ET MILIEU DE CULTURE DE	
<i>BACILLUS SUBTILIS</i>.....	29
I-1: Matériel biologique.....	29
I-2: Milieu de culture.....	29
CHAPITRE II : FORMULATION DU STARTER DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i>.....	30
II-1 :Matériel végétal.....	30
II- 2 : Evaluation bactériologique du starter	30
CHAPITRE III :METHODE DE FERMENTATION DES GRAINES DE <i>PARKIA</i>	
<i>BIGLOBOSA</i>.....	30
III- 1: Fermentation des cotylédons de <i>Parkia biglobosa</i>.....	30
III- 2: Suivi de la température.....	30

CHAPITRE IV : METHODES D'EXTRACTION DES HYDROLYSATS	31
IV-1: Extraction des hydrolysats du nétéu frais.....	31
IV-2: Extraction des hydrolysats du nétéu sec.....	31
CHAPITRE V: METHODES DE STABILISATION DES HYDROLYSATS.....	31
V-1: Stabilisation des hydrolysats du nétéu sec.....	31
V-2: Stabilisation des hydrolysats du nétéu frais.....	31
CHAPITRE VI: ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES HYDROLYSATS	
STABILISES DU NETETU FRAIS ET DU NETETU SEC.....	32
CHAPITRE VII : ANALYSES BIOCHIMIQUES DES HYDROLYSATS	32
VII -1: Détermination de la Teneur en protéines des hydrolysats issus du nétéu frais et des hydrolysats issus du nétéu sec.....	32
VII -2 : Détermination du taux de cendres des hydrolysats issus du nétéu frais et des hydrolysats issus du nétéu sec.....	33
VII -3 : Détermination du taux de matière grasse des hydrolysats issus du nétéu frais et des hydrolysats issus du nétéu sec.....	34
VII - 4 : Détermination des sucres totaux dans les hydrolysats issus du nétéu frais et dans les hydrolysats issus du nétéu sec.....	35
VII -5 : Détermination des minéraux dans les hydrolysats issus du nétéu frais et dans les hydrolysats issus du nétéu sec : fer, calcium, magnésium ,cuivre , zinc et potassium par spectrophotométrie d'absorption atomique.....	36
VII -6 :Détermination de l'extrait sec contenu dans les hydrolysats issus du nétéu frais et dans les hydrolysats issus du nétéu sec.....	37
CHAPITRE VIII : DETERMINATION DE LA MATIERE SECHE SOLUBLE DANS LES HYDROLYSATS ISSUS DU NETETU FRAIS ET DANS LES HYDROLYSATS ISSUS DU NETETU SEC.....	37
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	39
RESULTATS.....	39
I : FORMULATION DU STARTER	39
II : FERMENTATION DES GRAINES DE <i>PARKIA BIGLOBOSA</i>.....	40
II-1 Fermentation des cotylédons de <i>parkia biglobosa</i>.....	40

II -2: Suivi de la température.....	41
III : STABILISATION DES HYDROLYSATS DU NETETU.....	42
III -1: Stabilisation des hydrolysats du Nététu frais.....	42
III -2 stabilisation des hydrolysats issus du nététu sec.....	43
IV : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES HYDROLYSATS STABILISES DU NETETU SEC ET DU NETETU FRAIS.....	45
V : ANALYSE BIOCHIMIQUE DES HYDROLYSATS.....	47
VI: DETERMINATION DE LA MATIERE SECHE SOLUBLE DANS LES HYDROLYSATS ISSUS DU NETETU FRAIS ET DANS LES HYDROLYSATS ISSUS DU NETETU SEC.....	49
DISCUSSIONS.....	50
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	54
BIBLIOGRAPHIE.....	58



PRESENTATION DE L'INSTITUT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE (ITA)

INSTITUT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE (I.T.A.)

1. Historique de l'entreprise

L'I.T.A., créé en 1963 par les autorités sénégalaises était à l'origine un Etablissement Public de Recherche Appliquée (E.P.R.A.).

En 1966, l'I.T.A. devient un Etablissement Public à caractère Administratif (E.P.A.) sous la tutelle du département administratif chargé de la recherche scientifique.

De 1968-1974 l'I.T.A. a connu un essor considérable avec l'assistance de la F.A.O.(Food Agriculture Organisation) qui a assuré la mise en place de équipements , fourni l'assistance d'experts internationaux et en fin pourvu la formation d'homologues sénégalais devant assurer la relève .

En juillet 1985, l'I.T.A., redevient un Etablissement Publique à caractère Industriel et Commercial (E.P.I.C.), placé sous la tutelle du Ministère du Développement Industriel et de l'Artisanat (M.D.I.A.) . Ce retour a pour but de replacer l'I.T.A. dans le cadre de la politique générale de développement.

Devant la conjoncture économique particulièrement difficile pour les pays en voie de développement, les autorités ont opté pour de nouvelles orientations tendant à moyen terme à assurer de manière substantielle l'autofinancement de l'I.T.A.

En 1989, l'I.T.A. met ainsi en place un plan de développement à moyen terme (1990-1995) permettant son autofinancement, tout en poursuivant sa mission initiale de recherche et de développement technologique.

Depuis 1995, l'I.T.A. est devenu un Etablissement Publique à caractère Scientifique (E.P.S.) et est sous la tutelle du Ministère de l'Industrie et de l'Artisanat.

2. Activités annuelles

L'I.T.A. offre essentiellement à sa clientèle cinq produits et services soit :

- Recherche et développement;
- Transfert de technologie et d'assistance aux P.M.E./P.M.I.et autres partenaires du secteur agro-alimentaire;
- Contrôle de la qualité;
- La formation;
- Des activités de production et d'incubation.

3. Mission et objectif

La mission de l'I.T.A. se définit comme suit:

- > Contribuer à l'amélioration des performances du secteur agro-industriel au Sénégal et des sous - région en intervenant dans tout le processus des transformations et de conservation

des produits alimentaires pour la recherche, le développement et le transfert technologique.

De façon plus précise, cette mission implique les actions suivantes :

- > Mener les recherches , études et actions concernant le traitement, la transformation, le conditionnement, la conservation et le stockage de toutes les denrées alimentaires et leur sous - produits;
- > Mettre en valeur de nouvelles ressources alimentaires locales dérivées notamment des produits de la pêche, de l'agriculture et de l'élevage;
- > Assurer la mise au point de la diffusion d'aliments de valeur nutritive adaptés aux goûts et pratiques alimentaires comme au moyen financier des consommateurs;
- > Participer au contrôle de la qualité des produits alimentaires aux stades de la formation et de la commercialisation;
- > Contribuer à la formation des corps de métiers de l'alimentation.

UNITE DE BIOTECHNOLOGIE / I.T.A

Domaine de compétence:

L'unité biotechnologie de l'I.T.A. est un laboratoire de recherche et de développement en microbiologie appliquée. Elle assure également la production de starters ainsi que l'assistance technique pour la mise en route et le suivi d'unités de fermentation.

Champs d'application

> Amélioration des procédés de préparation des aliments fermentés traditionnels africains

Mise au point de starter . Conception d'unités de production semi - industrielles

> Valorisation des productions agricoles locales.

Mise au point d'aliments à haute valeur énergétique à base de céréales, légumineuses et tubercules fermentés.

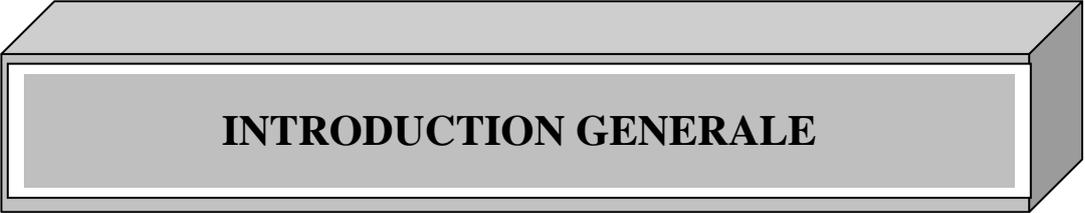
Production de vin et de vinaigres à partir de jus de fruits

> Valorisation des sous-produits de l'agriculture.

Valorisation des sous-produits de la rizerie (production d'alcool, de vinaigre, d'acide citrique, d'édulcorants, ...).

> Valorisation des pailles de cultures par ensilage pour l'alimentation du bétail.

> Production de métabolites microbiens (acides aminés, enzymes, vitamines, biopolymères, arômes, antibiotiques).



INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'intérêt d'utiliser des enzymes pour la synthèse des arômes a été mis en évidence il y a plusieurs dizaines d'années. En 1956, Hewitt et *al.* Montraient la possibilité de restaurer l'arôme d'un aliment par apport d'un extrait enzymatique végétal en prenant par exemple l'arôme du cresson et sa régénération à l'aide d'un extrait enzymatique de moutarde.

Les enzymes d'origine végétale, animale ou microbienne sont depuis longtemps largement utilisées dans des réactions de synthèse en chimie organique (Wong et Whitesides, 1994). Ces enzymes permettent en effet d'utiliser des pressions, pH et températures modérés et offrent souvent l'avantage d'être énantioselectives. De nombreux procédés enzymatiques ont donc été développés pour la synthèse de substances chimiques odorantes utilisables dans les compositions aromatiques. Le développement et la maîtrise des techniques d'immobilisation des enzymes permettent le recyclage des biocatalyseurs et l'amélioration de leur stabilité.

Les bioprocédés de synthèse peuvent également être optimisés par l'utilisation des milieux réactionnels biphasiques ou non aqueux. L'avantage de la production biotechnologique de substance d'arômes par voie enzymatique se trouve encore renforcé par le fait qu'en respectant, au niveau du procédé, un certain nombre de recommandation, il est possible d'attribuer le label naturel aux substances d'arômes ainsi obtenues. La biotechnologie devrait donc connaître encore d'importants développements dans le secteur des arômes comme en témoignent les diverses enzymes déjà utilisées.

Partout dans le monde plusieurs industries agroalimentaires s'activent dans la production d'arôme.

C'est ainsi qu'on note des arômes artificiels qui sont des substances chimiques seules ou en mélange développe un arôme particulier dans une denrée. En général, l'utilisation des arômes artificiels est couverte par des secrets de fabrication. Les principaux arômes artificiels sont les acétates, les butyrates, les caprates, les caproates, les isovalérates et valérinates d'amyle, de butyle, d'isoamyle, ainsi que l'acétone, l'acide pellargonique, l'alcool benzyl-isopropylique, l'anéthol, le diacétyle, le menthol, la vanille etc. En revanche les arômes naturels existent et peuvent être obtenus à partir des substances végétales, quelque fois animales au moyen de traitements appropriés mécanique ou physique.

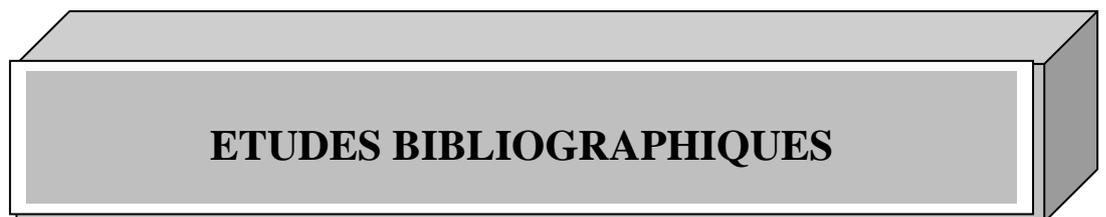
La remarque fondamentale la plus patente est la prolifération des arômes d'origine étrangère en Afrique de manière générale et au Sénégal de manière particulière. C'est ainsi qu'on note la présence des arômes " maggi", des "bouillons" cube, "ajino-moto", "mami" et d'autres encore que les gens utilisent comme additifs alimentaires. Ces arômes dont l'origine de la matière première où le procédé de fabrication pour certains demeurent inconnus, ont tendance à concurrencer et à faire disparaître les vertus de certains produits locaux. Certaines maladies qu'elles soient bénignes ou graves dont leur origine n'est pas encore décelée, dériveraient de ces arômes ou additifs alimentaires de provenance étrangère. Partant de cette idée le gouvernement Sénégalais par le biais du Fonds National de Recherches Agricoles et Agroalimentaires (**FNRAA**) a financé le projet intitulé :«Développement de la filière néré dans le département de Sédhiou». Ce projet a pour mission de développer la filière de la production jusqu'au produit fini .Ainsi l'Institut de Technologie Alimentaire (**I.T.A.**)

dans sa part du projet s'occupe de la transformation des cotylédons du «*néré*» (*Parkia biglobosa*) en utilisant un starter qui permet d'obtenir un produit fini stable tant sur le plan microbiologique que chimique. Le produit obtenu (le *nététu*) est un condiment local très important au plan nutritionnel. En effet, c'est à partir du *nététu* obtenu par la fermentation des cotylédons du caroubier africain (*Parkia biglobosa*), dont la richesse en protéine n'est plus à démontrer, qu'on va extraire les hydrolysats.

C'est ainsi notre étude a pour objectif de déterminer les qualités nutritionnelles des hydrolysats issus de la fermentation des graines de *néré*. Pour cela il est nécessaire :

- ✓ de mettre au point une méthode d'extraction et de stabilisation des hydrolysats issus de la fermentation des graines de *néré* ;
- ✓ de caractériser biochimiquement les hydrolysats issus de la fermentation des cotylédons de *Parkia biglobosa*.

Au terme de ce travail, il sera proposé un procédé de formulation d'arôme liquide à partir des hydrolysats issus de la fermentation des graines de *Parkia biglobosa*.



ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

Le nétéu est un condiment obtenu par la fermentation des graines décortiquées et cuites du caroubier africain (*Parkia biglobosa*). Il est diversement appelé selon les pays et les ethnies en Afrique : nékétou en Sérère du Sénégal, nétéu en Wolof au Sénégal, banétéu en Diola du Sénégal ; soubala ou soumara en Malinké sisselé en Sénoufo ; daddawa ou dawadawa en Haoussa du Nigéria, iru en Yoruba du Nigéria et afinti au Bénin.

Le nétéu fait l'objet d'importantes transactions commerciales aux plans national et sous-régional. En Afrique de l'Ouest, la transaction se situe principalement entre la Guinée, le Mali et le Sénégal. La production et la commercialisation au Sénégal font intervenir plusieurs partenaires qui s'organisent du village où se fait la cueillette des fruits et la production vers les centres où se fait la vente.

I. LA PLANTE

Parkia biglobosa (Jacq) Benth.

I-1: Synonymes

Mimosa biglobosa/ Jacq

Mimosa taxifolia / Pers

Inga biglobosa/ Wild

Inga senegalensis/ DC

Parkia africana/ R.Br

I-2: Noms vernaculaires

Bambara : néré, nété

Diola : bou gilay, bou djilay, bou nok bou niek, bou tifa

Sérère : séou, yéou

Toucouleur: nété néré

Wolof: oul

I-3: Historique

La mention la plus reculée sur le végétal remonte à ADANSON qui ,dans son ouvrage intitulé « voyage au Sénégal » écrit en 1751 alors qu'il se trouvait à Albreda en Gambie: << le Farobier est un autre grand arbre, aussi commun que le benten (*Ceiba pentandra*), mais d'un usage tout aussi différent à cause de la dureté et de la pesanteur de son bois. Ses fruits sont fort recherchés par les Noirs .Ce sont des gousses semblables à celles du haricot mais de plus d'un pied de longueur ,qui renferment des semences noires, aplaties, semblables à de grosses lentilles ,et enveloppées d'une chair jaune farineuse. Ils mangent cette chair qui souvent leur tient lieu de toute autre nourriture, surtout quand ils voyagent, elle est fort bonne, nourrissante et d'un goût d'épice sucrée et très agréable>> ADANSON (1751, cité par Charles Haddad, 2000)

Notons que le terme de Farobier utilisé par ADANSON pour désigner l'espèce, dérive probablement du nom portugais de la plante “ Faroba ”.

MUNGO PARK(1775, cité par Charles Haddad , 2000) à qui le genre est dédié, écrit aux abords du Mali << le 28 Avril le matin de bonne heure, nous partîmes de Souseta, et sur les dix heures nous arrivâmes à une ville non murée appelée Manna. Ses habitants étaient alors occupés à recueillir des fruits des arbres nittas, qui sont très connus dans ce canton. Les cosses sont longues et étroites et contiennent quelques semences noires, enveloppées dans la poudre fine et farineuse dont j'ai parlé, elle a un goût mucilagineux et doux, lorsqu'on la mange seule, elle est visqueuse, mais mêlé avec du lait ou de l'eau, elle forme un aliment agréable et nourrissant >>

En 1895, le Révérend Père SEIBIRE écrivait dans son ouvrage « Les plantes utiles du Sénégal » : c'est des plus beaux arbres du Sénégal. Il forme un immense parasol d'où pendent une foule de fleurs en boule de couleur pourpre, produisant un très bel effet. Aux fleurs succèdent des longues gousses remplies d'une pulpe jaune sucrée assez agréable. Cette pulpe sert même à faire une boisson rafraîchissante. Les graines qui sont noyées dans cette pulpe sont parfois torréfiées et employées en guise de café. Mais souvent les Noirs les gardent en forme de petites tablettes pour préparer diverses sauces : c'est le nététu. L'écorce infusée donne une bonne tisane à prendre après la rougeole et la petite vérole. La vapeur de la décoction de l'écorce en inhalation calme le mal de dents. Kokwaro J.O (1976, cité par Charles Haddad,2000)

I-4 : Milieu écologique et botanique

Le caroubier africain (*Parkia biglobosa*) est une légumineuse appartenant à la famille des Mimosacea. C'est un arbre dont la longueur est comprise entre 10 à 15m avec un tronc robuste court de forme cylindrique.

Au niveau des branches, se trouvent des feuilles alternes et bipennées avec 10 à 15 paires de pinnules portant chacune 30 à 60 paires de folioles oblongues longues de 1 cm sur 2mm serrées les unes contre les autres. Les feuilles sont rattachées aux branches par des pétioles à base épaissie avant la première paire de pinnule. A la base de ces pétioles se trouve une forte glande en forme de cratère. *Parkia biglobosa* fleurit en fin de saison sèche avec de belles inflorescences en boule rouge dont le diamètre est environ 5cm suspendues à un long pédoncule. Les fruits sont de longues gousses dont leur longueur est comprise entre 20 et 40cm et la largeur 2cm. La forme des fruits est légèrement arquée. Ils sont suspendus en grappes au réceptacle des fleurs. Les fruits mûrissent entre Mai et Juillet et une pulpe jaune farineuse remplit les gousses.

C'est une plante très répandue dans les zones du Sahel et des savanes de l'Afrique de l'Ouest et de l'Est. Elle a une préférence pluviométrique comprise entre 600- 700mm. Ceci justifie son abondance en Casamance.

Cependant quelques plantes peuvent survivre dans les zones plus sèches 300- 400mm. On note d'autres espèces de *Parkia* comme *Parkia clappertoniana* Keay observées au Ghana et au Sud du Nigéria, *Parkia bicolor* A. Chev ; *Parkia filicoidea* et enfin *Parkia madagascariensis*. La pollinisation se fait par les chauves souris et les abeilles qui fréquentent la plante pour se nourrir (Ouedrago, 1995).

Il faut 7 à 8 ans pour les premières récoltes et 12 à 15ans pour que la plante atteigne sa taille définitive.

I-5 : LA Composition chimique des graines crues de *Parkia biglobosa*

Plusieurs auteurs ont donné la composition chimique des graines du caroubier africain (*Parkia biglobosa*). Ils ont remarqué la valeur nutritive de ces graines. Parmi ces auteurs on note : (Fetuga et al ; 1974; Eka, 1980, Ibrahim et Antai, 1986), les cotylédons cuits contiennent par rapport à la matière sèche 41,7 à 49,9% de glucides ; 23,4 à 42,5% de protéines, 15,2 à 24,6% de lipides et 6,2 à 7,2% de cendres.

Certains éléments minéraux ayant un rôle physiologique important ont été mis en évidence dans les graines cuites de *Parkia biglobosa* notamment le calcium, le phosphore, le magnésium, le cuivre et le zinc (Fetuga et al ; 1974 ; Adébisi et al, 1986 ; Lockett et al , 2000). Les facteurs antinutritionnels majeurs ont été également trouvés dans les cotylédons de *Parkia biglobosa*. C'est ainsi qu'Addy et al (1995) ont mis en évidence les inhibiteurs trypsiques alors que Eka (1980) isole l'acide phytique, quant aux oligosaccharides, Odunfa (1983) les a décelés sur les cotylédons.

Ces cotylédons riches en macromolécules tels que les glucides, les lipides, les protéines subiront des transformations biochimiques par leurs enzymes respectives pour donner le nététu

II- FABRICATION TRADITIONNELLE DU NETETU

La transformation des graines du néré débute par une cuisson dans l'eau bouillante durant 12 à 24 heures.

Cette cuisson est destinée à ramollir l'enveloppe externe extrêmement résistante. Au cours de cette première cuisson, les graines gonflent et pour certaines leurs coques s'ouvrent partiellement. L'enveloppe est alors partiellement ramollie pour être séparée des cotylédons. Près d'une heure et 30mm seront alors nécessaires pour décortiquer 25kg de graines au pilon et au mortier. Au paravant les femmes tamisent du sable qu'elles rajoutent au moment du pilage pour servir d'abrasif et ainsi faciliter l'opération.

Le lavage qui suit, s'effectue au moyen de passoire ou de nasse en rônier (*Borassus aethiopium*). Il permet d'éliminer le sable ainsi que les coques réduites en poudre par décorticage. Cette opération est très importante car elle conditionne en grande partie la qualité du produit fini. En effet le consommateur ne doit pas retrouver d'impuretés (fragment de coque ou de sable) dans le produit (Charles Haddad, 2000).

Les cotylédons ainsi propres, sont entiers de consistance ferme et de couleur brun- clair. Pour 25kg de matière première, ces deux opérations, décorticage et lavage auront nécessité près de 3 heures d'un travail pénible.

Une nouvelle cuisson débute alors, elle durera 3 heures. Après égouttage, les cotylédons sont placés dans des sacs en toile de jute ou en nylon et laisser à fermenter pendant 48 heures à 72 heures.

C'est au cours de la fermentation que se développent les caractéristiques organoleptiques du nététu : odeur forte, goût prononcé et couleur brune foncé. Durant la fermentation il se dégage une forte odeur d'ammoniac issue de la protéolyse enzymatique. Les bactéries du type *Bacillus* sp sont les principaux microorganismes qui se développent au cours de cette fermentation.

Après fermentation, un salage ainsi qu'un séchage partiel permettront une meilleure considération du produit fini obtenu.

III: LES PARAMETRES OPTIMAUX POUR LES MICROGANISMES RESPONSABLES DE LA FERMENTATION DES COTYLEDONS DE *PARKIA BIGLOBOSA*

Les micro-organismes sont soumis à des conditions optimales pour un bon déroulement de leurs activités enzymatiques ou de leur croissance. Ainsi certains auteurs ont mené des études pour démontrer les conditions favorables aux bactéries lors de la fermentation des cotylédons du caroubier africain (*Parkia biglobosa*).

Lors de la fermentation, l'hydratation des graines est un préalable car elle permet une bonne répartition et facile des microorganismes dans les cotylédons. Les paramètres contrôlés sont la température, le temps, et les humidités relatives. La température 35°C pendant 36 heures ou 40°C pendant 48 heures, ont été recommandées pour la fabrication du dawadawa, les humidités relatives correspondantes sont respectivement 51% et 71% (Odunfa et Adewuyi, 1985). Le pH est également contrôlé, et il est de 8 (Ndir, 2002).

Ces barèmes revêtent d'une grande importance dans la fermentation contrôlée des cotylédons de *Parkia biglobosa*.

IV: LES COMPOSES CHIMIQUES DU NETETU

Kerharo (1974), en rapportant les travaux de Toury sur l'analyse comparée des graines crues non fermentées et du nététu vendu sur le marché de Dakar, donne 7,33% et 14,8% de teneur en eau, 34,6% et 35%, de protéines ; 21,0% et 29,0% de lipides, 32,0% et 16,4% de glucides totaux ; 3,9 et 6,0% de celluloses 4% et 4,8% de matières minérales.

Le dawadawa autre appellation du nététu au Nigéria contient 40% de protéines, 35% de matières grasses et 15% de glucides (Campbell-Platt, 1980).

En comparant la lysine contenue dans le dawadawa et celle trouvée dans le jaune d'œuf, on note respectivement 6,5g/16g N et 7g/ 16g N. Il contient également environ 60% d'acides gras insaturés dont l'acide linoléique est majoritaire, soit 40% ; la riboflavine est aussi mise en évidence dans le dawadawa (0,6mg/ 10g).

Durant la fermentation plusieurs transformations biochimiques se déroulent et entraînent soit une augmentation soit une diminution de certains composés chimiques des cotylédons crus de *Parkia biglobosa*.

C'est ainsi qu'on observe une augmentation relative des protéines et des lipides, et celle des teneurs en éléments minéraux tels que le zinc, le calcium et le phosphore. Eka (1980), met en évidence l'amélioration légère des teneurs en vitamine B1 et B2 tandis que la vitamine C diminue.

Il signale également une diminution des facteurs anti-nutritionnels et toxiques comme les oxalates, les phytates et les glucosides cyanogènes.

Ces transformations biochimiques confèrent au nététu un caractère organoleptique particulier. C'est un condiment riche en protéine.

V : LES MICROORGANISMES FAVORISANT LA FERMENTATION TRADITIONNELLE ET LES MICROORGANISMES D'ACCOMPAGNEMENT

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude microbiologique du nététu fabriqué traditionnellement à fin de trouver les bactéries responsables de la fermentation spontanée et celles accompagnatrices. De ces études plusieurs espèces du genre *Bacillus* ont été mises en évidence.

C'est ainsi qu'Odunfa et Komolafe (1981) attribuent au *Bacillus subtilis* comme responsable de la fermentation spontanée des graines de *Parkia biglobosa*, alors qu'Ogbadu et Okagbue (1988) ont mis en évidence le *Bacillus pumilis*. Le *Bacillus licheniformis* est considéré par Jideani et Okeke (1991) comme responsable de la fermentation des cotylédons de *Parkia biglobosa*.

Il ressort de ces études que le *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* sont les espèces les plus considérées comme responsables de la fermentation des graines de caroube africaine par le procédé traditionnel. Ces germes sont très aptes à l'hydrolyse protéique. On les trouve souvent dans les sols pauvres en nutriments.

En dehors de ces bactéries responsables de la fermentation spontanée des cotylédons du néré (*Parkia biglobosa*) ; d'autres microorganismes ont été mis en évidence. Cette microflore est à l'origine des altérations notées dans le nétéu. La provenance de ces bactéries est attribuée aux ustensiles utilisés et le milieu de fabrication du nétéu lors de la manutention. Parmi cette microflore, on note les *Staphylococcus sp*, *Micrococcus sp*, *Proteus sp*, *Leuconostoc mésenteroides*, *Leuconostoc destrictum* (Antai et Ibrahim, 1986). La fermentation contrôlée aura pour objectif d'éliminer cette microflore d'accompagnement et d'utiliser le *Bacillus subtilis* comme starter qui sera stable.

V-1 : Evolution du pH et de l'acidité titrable

Ogbadu & Okagbue (1988) ont montré que la température des cotylédons de caroube africaine augmente de 28°C (0 heure) à 42°C après 48 heures de fermentation du dawa dawa, tandis que le pH évolue de 6 à 8,3. Ikenebomeh et *al.*, (1986) ont également démontré que la croissance microbienne est en relation étroite avec l'augmentation simultanée du pH et de l'acidité titrable durant la fermentation du dawa dawa.

Le pH et l'acidité titrable n'évoluent pas quand les cotylédons sont stérilisés par autoclavage (121°C pendant 15mn) ou ionisation (11 Kgy) ; (Ndir, 2002). Ceci démontre la présence obligatoire des microorganismes pour initier la fermentation spontanée.

V-2 : Processus exothermique

La fermentation alcaline du dawa dawa est un processus exothermique : la température des cotylédons de caroube africaine augmente de 26-28°C (0 heure) à 42°C après 48 à 72 heures de fermentation (Antai et Ibrahim, 1986 ; Ogbadu et Okagbue, 1988). L'augmentation de la

température résulte de l'activité métabolique des microorganismes. La température qui prévaut dans le substrat durant la fermentation crée les conditions idéales pour l'activité des enzymes protéolytiques des microorganismes. La combinaison d'un pH plus élevé et d'une production d'ammoniac libre permet, à ces températures élevées, la croissance rapide des germes utiles responsables de la fermentation traditionnelle. Ces conditions sont défavorables à la croissance des germes néfastes susceptibles d'altérations.

VI : FERMENTATION CONTROLEE DES COTYLEDONS DE *PARKIA BIGLOBOSA* EN UTILISANT LE STARTER DE *BACILLUS SUBTILIS*.

En dehors de la fermentation traditionnelle des graines de *Parkia biglobosa*, un autre procédé moderne est appliqué : c'est la fermentation contrôlée en utilisant le starter de *Bacillus subtilis*. Elle permet d'obtenir du nétéu dont les contaminations seront très minimales par rapport à la fermentation traditionnelle. Six étapes interviennent successivement pour sa réalisation à savoir le décortilage, le trempage, la cuisson, l'inoculation, la fermentation et le salage et séchage.

VI- 1: le décortilage

Les graines entières de caroube africaine (*Parkia biglobosa*) sont préalablement torréfiées au tambour chauffant, elles sont en suite décortiquées par passage dans un moulin à marteau couplé à un souffleur à la sortie. Cette dernière opération permet la séparation des cotylédons et du péricarpe.

VI- 2: Le trempage

A la suite du décortilage, les graines sont trempées dans de l'eau filtrée pour leur réhydratation. Pour cela, l'eau est chauffée à une température de 80°C ensuite on verse les cotylédons puis on les maintient à cette température pendant 15 heures

VI -3 : la cuisson

Après le trempage, les graines sont mises à cuire pendant 2 heures à une température supérieure à 100°C. Cette étape permet de minimiser les contaminations secondaires et de doubler la quantité des graines. La quantité d'eau utilisée pour le trempage et la cuisson est fonction de celle des graines Ndir (2002) a utilisée 25kg pour 60L d'eau filtrée.

VI- 4: l'inoculation

La cuisson est suivie de l'inoculation, après refroidissement de l'eau à 80°C. Certains inoculent la suspension bactérienne par pulvérisation, d'autres mettent directement la poudre du starter. La dose à inoculer est également proportionnelle à la quantité des graines. C'est ainsi que Ndir (2002) a pulvérisé 2 ml de suspension bactérienne pour 1kg de cotylédons. Ceci correspond à une dose d'inoculation de 10^6 spores par g de cotylédon.

VI- 5: La fermentation

Les cotylédonsensemencés par la culture starter sont mis dans des casiers (10kg/casier soit 59kg de cotylédons/m²) soit dans des barquettes qui seront mises dans une chambre de fermentation ou dans l'étuve à

une température comprise entre 30 – 35°C. Les conditions d'aération sont de 0,085m³ d'air par kg. La fermentation dure 72 heures. En fin de fermentation les cotylédons atteignent une température de 40°C avec un pH et un taux de matière sèche respectivement supérieur à 8 et 35%.

VI- 6: Le salage et le séchage

Après la fermentation de 72 heures les graines sont mises à sécher au soleil sous claie et à l'abri d'un moustiquaire ; elles sont salées à raison de 8%. Le taux final de matière sèche est de 65%.

VII: LES ENZYMES BACTERIENNES PRODUCTRICES D'AROMES

VII -1 : Les Glycosidases

Dans les tissus végétaux et dans les fruits de nombreux métabolites secondaires d'intérêt aromatique sont sous forme d'hétéroside non volatil et peu odorant échappant ainsi à la perception olfactive. Ces composés glycoconjugués peuvent être hydrolysés, par des enzymes capables de scinder les liaisons osidiques et libérer des substances d'arômes olfactivement importantes (Enzymes en Agroalimentaire).

VII- 1-1 : Les β - Glycosidases

Dans les amandes issues des noyaux de cerise ou d'abricots, on trouve l'amygdaline qui est un hétéroside dont l'hydrolyse par la β -glycosidase donne l'aglycone qui est le mandélonite. Ce dernier sous l'action de la mandélonite-lyase donne le benzaldéhyde qui est une substance d'arôme olfactivement importante.

De nombreux travaux ont été consacrés à la structure et à la réactivité des hétérosides rencontrés dans la plupart des fruits mais aussi dans les jus de fruits et boissons fermentées qui en découlent (Maarse,1991, William et *al.*, 1993, Berger,1995). Des composés odorants très importants comme la β -damascénone, la β -ionone, les ionols et la cétone framboise dérivent ainsi des précurseurs hétérosidiques. Dans les gousses vertes de vanille on trouve des glucosides phénoliques et un hétéroside ou l'aglycone est la vanille.

Les glycosidases utilisées pour hydrolyser les hétérosides sont donc rencontrées en tant qu'activité principale ou secondaire dans les préparations commerciales d'origine végétale (émulsine d'amande) ou fongique (hespérinidase et pectinase d'*Aspergillus niger*). Il faut préciser que ces différentes glycosidases n'ont pas le même comportement lorsqu'elles sont appliquées à la préparation d'hétérosides, ce qui se traduit par des différences de rendement

d'hydrolyse et par des différences qualitatives au niveau des diverses aglycones obtenues (Chassagne et *al.*1995). En fonction de l'origine de l'activité de la β -glycosidase le rendement d'hydrolyse se situe entre 90% et 100%.

VII - 1-2: La β -Thioglycosidase

Un certain nombre de végétaux et de fruits renferment des thioglycosides qui sont à l'origine de la formation, suite à la rupture mécanique des structures cellulaires, de composés du goût brûlant et piquant. Ces composés sont caractéristiques des piments (capsaïcines), des poivres (pipérine et ses isomères pipérylyne), des gingembres (gingérols, shogaols, du raifort (sinigrine) et des moutardes (Richard, 1992).

VII -2 : Les Lipases

Des lipases, catalysent à l'interface eau lipide, l'hydrolyse des liaisons ester formées par des acides gras et du glycérol. Ces enzymes agissent sur des substrats lipidiques qui s'organisent au contact de l'eau en film mono moléculaire, en couche biomoléculaire, en micelle, liposomes ou émulsions. Il existe de nombreuses lipases qui diffèrent par leur spécificité et par leur stabilité. Elles peuvent être en effet, spécifique d'acide gras à chaîne courte, d'acide gras à chaîne longue ou ne pas présenter de préférence particulière.

De nombreuses lipases d'origine microbienne sont actuellement commercialisées. Il est souvent difficile de les comparer par l'utilisation des tests standardisés mais comme le souligne Berger (1995), l'hydrolyse des triglycérides de l'huile d'olive à 37°C et pH 7,8 et l'hydrolyse de la tri butyrine à 30°C et pH 6,8 sont des tests généralement admis pour faire la distinction entre activités lipolytiques et activités estérasiques.

L'activation interfaciale est la caractéristique typique des enzymes lipolytiques. L'estérase possède un comportement de type Michaelis-Menten. Plusieurs types de réactions peuvent être catalysées par les lipases, ce sont notamment (hydrolyse d'ester, l'estérification (alcool et acide), la transestérification (alcool et ester) et l'inter estérification (ester et acide). La synthèse des substances odorantes fait appel à certaines de ces réactions et l'intérêt des lipases est encore accru du fait de leur énantiosélectivité.

VII -2-1: Hydrolyse d'ester du glycérol

Les acides gras libres à chaîne courte ont un rôle important dans la flaveur des produits laitiers en intervenant par exemple sur les caractéristiques et l'intensité de l'arôme de certains fromages. La libération d'acide butyrique par des lipases surtout actives sur les triglycérides comportant des acides gras en C₄, C₆, ou C₈ comme celle du *Mucor miehei* permet d'obtenir des notes aromatiques de type beurre (Enzymes en Agroalimentaire).

VII- 3 : Les Protéases

Les protéases ont longtemps été utilisées pour produire des aliments orientaux ainsi que des aromates comme la sauce au soja, les sauces de poisson. Elles sont maintenant utilisées dans trois principaux domaines. Les produits de la boulangerie, la production et la maturation des fromages et comme agents d'attendrissement des viandes.

Différentes protéases sont utilisées pour la production d'arômes (protéases immobilisées de *Penicillium duponti* pour l'hydrolyse des protéines de soja, pronase pour l'hydrolyse des caséines). Les produits finaux de ces réactions enzymatiques sont des petits peptides et des acides aminés qui contribuent à la fraction aromatique non volatile et sont généralement des précurseurs de la fraction aromatique volatile dans les végétaux. Ces produits d'hydrolyse protéique sont principalement des exhausteurs de goût qui peuvent ;si le degré d'hydrolyse n'est pas parfaitement contrôlé, être à l'origine d'amertume. Cette amertume est le résultat d'un taux trop important en acides aminés hydrophobes à l'extrémité N - terminale des peptides. Par ailleurs, certains acides aminés comme l'isoleucine et la valine sont des précurseurs de pyrazines.

Les protéases et peptidases sont utilisées dans l'industrie fromagère. Elles sont impliquées dans le processus de maturation des fromages au même titre que les lipases et les galactosidases. Durant les processus de maturation des fromages, des modifications en majeure partie d'origine enzymatique affectent les protéines, la matière grasse, les sucres et transforment le caillé frais en un fromage affiné ayant ses caractéristiques organoleptiques propres. La protéolyse a dans ce cas deux répercussions essentielles. D'une part en attaquant le réseau protéique qui constitue l'armature des fromages, elle en modifie la texture et d'autre part, elle participe à la formation de la flaveur en produisant des peptides ainsi que des acides aminés libres dont certains sont des précurseurs de composés d'arômes. La méthionnase bactérienne est employée pour la génération d'arôme dans le fromage Cheddar. Elle

transforme les acides aminés contenant un atome de soufre en méthanthiol, l'un des constituants typique de l'arôme Cheddar (Lindsay et Rippe ,1986).

Cependant les protéases doivent être employées avec précaution car elles sont susceptibles d'engendrer des défauts d'arôme par relargage de résidus hydrophobes. Lorsque des protéases comme la papaïne sont utilisées, l'acide aminé obtenu est l'acide glutamique, composé bien connu comme exhausteur de goût et sa saveur « viande » caractéristique. En fait c'est l'acide aminé influençant le plus la flaveur des aliments, viennent ensuite la méthionine, la leucine et l'isoleucine. La cystéine est également importante dans le développement des flaveurs de la viande du fait de sa participation dans la réaction de Maillard (Grosch et Zeiler- Hilgart, 1992). Des autolysats de levures peuvent être utilisés comme source de protéases et sont souvent corrélés à de fortes concentrations en acide glutamique. Après protéolyse, il est encore possible d'intensifier la flaveur par traitement avec une glutaminase qui a pour but d'augmenter le taux d'acide glutamique d'un facteur 2,6. Une glutaminase résistante aux concentrations salines élevées a d'ailleurs été récemment brevetée pour améliorer la flaveur dans les conserves de petits légumes au vinaigre (Daiwa- Kasei, 1991).

Par analogie avec les lipases et les carbohydrases, l'hydrolyse peut être partiellement réversible pour certaines enzymes dans des conditions particulières. Par exemple l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* catalyse la formation d'une amide entre le groupement NH₂ de l'acide aspartique et le groupement COOH de la L-phénylalanine pour produire de l'aspartame (Lee et *al.*, 1992).

En somme ces différents types d'enzymes d'origine microbienne revêtent d'une importance dans la flaveur des aliments.

VIII : ACIDES AMINES CONTENUS DANS LES HYDROLYSATS DU NETETU.

Des études qualitatives ont été effectuées sur les hydrolysats issus du nététu pour mettre en évidence les différents acides aminés.

Ainsi Mame Seynabou Kane (2003) a montré la présence des acides aminés dans les hydrolysats du nététu. En effet dans les hydrolysats issus de la fermentation des cotylédons de *Parkia biglobosa* à 30°C pendant 3 jours, à 50°C pendant 2 jours et à 50°C pendant 3 jours tous les acides aminés sont présents à l'exception de l'arginine et du tryptophane. Cependant la présence de ces acides aminés varie selon les méthodes de fermentation utilisées (Mame Seynabou Kane, 2003)

IX: LES AROMES DE NETETU

Des études analytiques ont été faites sur les substances volatiles des nététu du commerce et sur ceux produits par des starters NTO₁ et NTO₂. Ces analyses sont faites uniquement sur les substances volatiles intervenant dans la flaveur du nététu. Ces arômes portent essentiellement sur les acides, les alcools, les aldéhydes, les pyrazines, les phénols et les composés soufrés.

IX- 1 : Les acides

(Ndir, 2002) a montré l'existence de plusieurs acides dans le nététu du commerce et celui produit par les starters NTO₁ et NTO₂. En effet l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide butanoïque et l'acide 3-méthylbutanoïque sont présents dans le nététu du commerce et celui produit par les starters. IL a mis en évidence la prédominance de l'acide 3-méthylbutanoïque avec 28,68% ; 29,47% et 31,99% du total des aires des pics des chromatogrammes des nététus de Casamance, du Mali et de la Guinée contre respectivement 14,51% ; 17,62% et 25,24% pour l'acide 2-méthylpropanoïque et 1,06% ; 18,33% et 21,34% pour l'acide acétique. Il signale encore l'acide acétique dans le nététu obtenu par la fermentation contrôlée en utilisant les starters NTO₁ et NTO₂ à raison de 13,22-38,03% et 25,12%-43,24% respectivement contre 1,06 à 28,33% pour les trois nététus du commerce. Les acides majeurs, acides 3-méthylbutanoïque et acide 2-méthylpropanoïque, sont au contraire moins représentés dans le nététu obtenu par fermentation contrôlée. L'acide butanoïque, l'acide pentanoïque et l'acide hexanoïque sont détectés à des proportions faibles dans les nététus.

IX -2 : Les alcools

(Ndir, 2002) a montré la prédominance d'un alcool de type 3-méthyl-1-butanol dans le nététu de Guinée, Casamance et du Mali à raison de 2,21% à 13,91% et son absence dans les nététus obtenus, par fermentation contrôlée.

IX-3 : Les aldéhydes

L'aldéhyde 3-méthylbutanal est détecté dans les nététus obtenus avec les starters NTO₁ et NTO₂ (1,66 à 10,96%) contre 1,62 et 4,0% respectivement dans le nététu de Guinée et du Mali, il note également la présence de l'hexanal dans le nététu de Casamance et celui obtenu par la fermentation contrôlée (Ndir, 2002) qui sont salés.

IX- 4 : Les Pyrazines

La présence des aldéhydes pyrazines a été détectée dans le nétéu du commerce et celui de la fermentation contrôlée notamment le 2,5-diméthyl pyrazine et 2,6-diméthylpyrazine mais les tétraméthyl pyrazines sont absentes dans le nétéu du Mali et dans celui de la fermentation contrôlée (Ndir, 2002).

IX- 5 : Le phénol

Il est montré la présence du phénol dans le nétéu du commerce mais également dans le nétéu obtenu par fermentation contrôlée avec une proportion plus faible dans ce dernier à raison de 0,24-0,31% et 0,19% respectivement pour les nététus du Mali, de la Casamance et de la Guinée(Ndir,2002).

IX- 6 : Les composés soufrés

(Ndir, 2002) a mis en évidence la présence du diméthyldisulfure dans le nétéu de la Casamance et le trithiolane à l'état de trace dans la fermentation contrôlée mais également dans le nétéu de commerce à raison de 0,46 à 1,20%.

Les nététus du commerce et ceux de la fermentation contrôlée présentent des profils aromatiques comparables. Ces différents composés volatiles que sont les acides, les alcools, les aldéhydes, les pyrazines, les phénols et composés soufrés confèrent au nétéu une saveur caractéristique. Par conséquent les hydrolysats issus du nétéu présenteraient les mêmes substances volatiles qui leur donneront un caractère organoleptique comparable à celui du nétéu d'où ils sont issus.

X : PREPARATION DES HYDROLYSATS DE PROTEINES

Les hydrolysats des protéines peuvent être utilisés pour la fabrication de soupes, de sauces, d'arômes ou de préparations diététiques voire médicales. Les enzymes utilisés sont des papaines, la trypsine ou des protéases alcalines de *Bacillus subtilis*. Ces traitements sont parfois complétés par l'action de certaines peptidases, pour réaliser l'hydrolyse complète et éviter ainsi les amertumes trop prononcées.

Plusieurs peptides issus de l'action des protéases possèdent des activités opiacées (exorphines) ou immunostimulantes.

X -1 : Suivi de l'hydrolyse

Parallèlement au suivi de l'azote solubilisé, un contrôle important dans la production d'hydrolysats est le degré d'hydrolyse, puisque les propriétés du produit final et notamment l'amertume sont directement liées à la taille des peptides. Certaines des propriétés fonctionnelles des hydrolysats sont liées au degré d'hydrolyse. Ce dernier reflète le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées et est égal à :

$$\text{DH} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

DH=Degrés d'Hydrolyse

h=nombre de groupements aminés libres a la fin de la réaction

h_{tot} = nombre de liaisons peptidiques à l'origine (nombre de résidus aminés -1) (Alder – Nissen, 1986 cité par Barzana et Garcia-Garibay, 1994)

L'estimation du niveau d'hydrolyse par DH est préférée au suivi du rapport.

AZOTE NON PROTEIQUE/AZOTE TOTAL

Ratio utilisé notamment pour le suivi en routine dans l'anchoitage (Durand, 1982). Ces différents ratios n'ont cependant aucune indication sur la longueur des chaînes peptidiques. Un indice de longueur des chaînes peptidiques peut toutefois être relié au DH

$$\frac{\text{DH}}{100} = \frac{1}{\text{LCP}} - \frac{1}{\text{LCP}_0}$$

LCP₀ = nombre d'acides aminés dans le substrat initial

Dans le cas d'une protéine de masse moléculaire d'au moins de 30.000, l'équation peut être réduite

$$\text{LCP} = \frac{100}{\text{DH}}$$

(Barzana et Garcia -Garibay, 1994)

L'évolution de l'hydrolyse peut être ainsi suivie au cours du temps afin d'obtenir la qualité du produit désiré.

Par ailleurs, selon Ney (1979,cité par Mackie,1982) ,le degré d'amertume des peptides obtenus est directement lié à leur hydrophobie ou plus précisément à la présence de groupements hydrophobes dans les résidus d'acides aminés composant le peptide .Ainsi la composition primaire en acides aminés des protéines hydrolysées est plus responsable du caractère amer du produit obtenu par la spécificité des protéases utilisées.

Tableau 1: Valeurs d'hydrophobie de peptides(d'après Mackie; 1982)

PEPTIDE	PAS D'AMERTUME	AMER	Q
Glu-Val	X		1120
Gly-Ser	X		20
Leu-Tyr		X	2645
Val-Leu		X	2055

L'hydrophobie moyenne (Q) d'un peptide est obtenue en calculant la moyenne des énergies libres des résidus d'acides aminés le composant

$$Q = \frac{\sum \Delta f}{n} \quad n = \text{nombre de résidus}$$

Lorsque la valeur de Q est inférieure à 1300 il n'y a pas d'amertume alors que le caractère amer est détecté au dessus de 1410. En revanche lorsque la masse moléculaire du peptide est supérieure 6000 aucune amertume n'apparaît même lorsque Q est supérieur à 1410 (Mackie, 1982)

X- 2: Synthèse de plastéines

Différentes solutions ont été proposées afin d'éliminer des hydrolysats l'amertume liée à la présence de peptides de petites tailles. La synthèse enzymatique à partir de petits peptides, des peptides de taille plus importante débarrassés du caractère amer est connue sous le nom de réaction de synthèse de plastéines. Cette réaction permet aussi l'enrichissement spécifique des peptides en acides aminés tels que l'acide glutamique, la leucine, etc... (Arai et al, 1975).

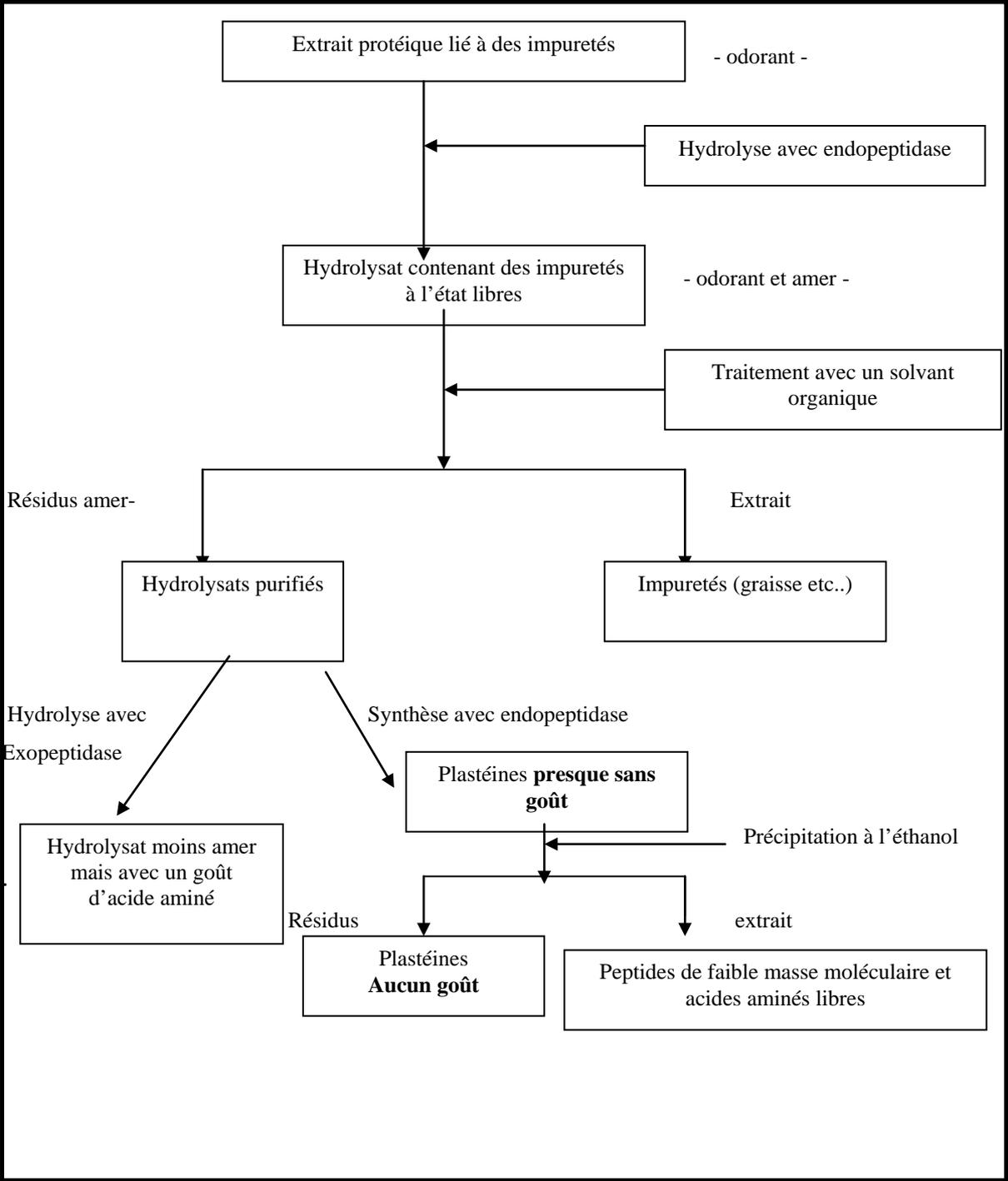


Figure 1: Procédé pour désodoriser et enlever l'amertume pour synthétiser les plastéines (Arai et al, 1975)

La synthèse des plastéines nécessite au moins trois conditions spécifiques qui sont différentes de celles de l'hydrolyse (Arai et al, 1975) :

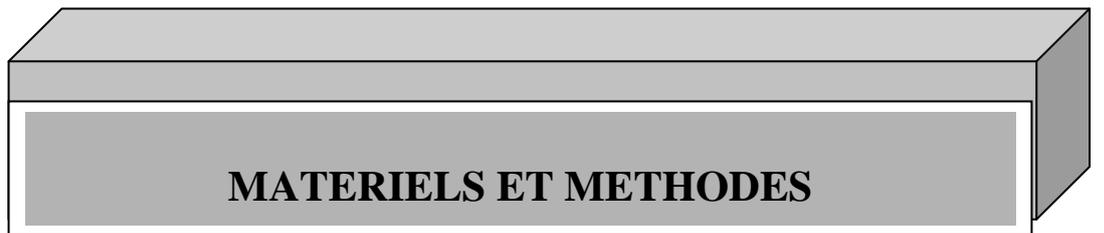
- les peptides doivent présenter des extrémités C- et N- terminales réactives pour la réaction de condensation ;
- la concentration des substrats peptidiques doit être importante afin de favoriser la réaction de synthèse selon la loi d'action de masse ;
- les pH optimum des protéases utilisés pour la synthèse sont différents de ceux déterminés pour l'hydrolyse.

CONCLUSION

Cette étude bibliographique a permis de connaître la composition chimique des graines de *Parkia biglobosa* fermentées ou crues. Il faut bien sûr signaler qu'il y a un peu de différences concernant les teneurs des composés chimiques. Le nétéu peut être obtenu par deux procédés dont le premier est de type traditionnel et le second est moderne, par l'utilisation d'un starter.

Dans tous les cas *Bacillus subtilis* est l'espèce responsable de la fermentation même si dans le premier cas, il existe des microflores accompagnatrices.

Bacillus subtilis est reconnu par sa très grande capacité d'hydrolyser les protéines grâce à ses protéases. La richesse des cotylédons en composés organiques comme les glucides, les protéines et les lipides déclencheront lors de la fermentation plusieurs activités enzymatiques précurseurs d'arôme caractéristique au nétéu. Les hydrolysats qui en seront issus serviront d'arômes liquides de nétéu.



MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE I : MATERIEL BIOLOGIQUE ET MILIEU DE CULTURE

I-1. : Matériel biologique

Dans ce travail les spores de *Bacillus subtilis* M4, issus de la collection de l'unité de Biotechnologie, ont servi d'agent de transformation. Elles sont conservées sur billes cryofuges à une température de -80°C .

I-2 Milieu de culture

La composition des deux milieux de culture (YGLA et TS) de *Bacillus subtilis* est donnée dans le tableau ci-dessous :

Tableau I-a: Composition du milieu Biologique de Bacillus subtilis

COMPOSITION ,G/L	MILIEU SOLIDE YGLA	MILIEU LIQUIDE TS
Extrait de levure (Prolabo)	3	
Extrait de viande (Prolabo)	10	
Peptone (Prolabo)	10	
Agar (Prolabo)	20	
Glucose (Prolabo)	20	
BCP	0.04	
NaCl (Prolabo)	5	7
Tryptone (Prolabo)		1

Pour éviter les réactions de Maillard, entre le glucose et les substances azotées à chaud, nous avons utilisé un autre flacon de 200ml dans lequel sont introduits 20g de glucose.

Après stérilisation à l'autoclave de marque SIMFER à 121°C pendant 20mn et refroidissement au bain -marie à 50°C , les 20g de glucose contenus dans les 200ml sont mélangés dans les 800ml contenant les autres constituants. Cette dernière étape rend le milieu YGLA complet. Ce milieu est coulé dans des boîtes de pétri sous la hotte où les spores de *Bacillus subtilis* seront ensemencées pour leur éventuel comptage, le milieu Tryptone Sel (TS) servant de tampon .

CHAPITRE II : FORMULATION DU STARTER DE BACILLUS SUBTILIS

II-1 : Matériel végétal.

Le matériel végétal est constitué par les cotylédons de *Parkia biglobosa*. Ils proviennent des marchés du département du Sédhiou dans la zone sud Sénégal où la plante pousse abondamment.

I1-2 Evaluation bactériologique du starter

Le starter utilisé se présente sous forme de poudre de nétéu préparé selon la méthode décrite par Mame Seynabou Kane et *al*, 2003. L'évaluation bactériologique est réalisée selon la méthode de dilutions décimales avec comme tampon le milieu tryptone sel et le comptage est effectué sur le milieu YGLA. La composition de ces deux milieux est donnée dans le tableau I-a

CHAPITRE III : METHODE DE FERMENTATION DES COTYLEDONS DE *PARKIA BIGLOBOSA*

III-1: Fermentation des cotylédons de *Parkia biglobosa*

Pour fermenter les cotylédons, nous avons utilisé 10 kg de cotylédons décortiqués qu'on a trempés dans 30L d'eau filtrée portée à 80° C pendant 17 heures. Après trempage, les graines sont cuites pendant 2 heures à une température supérieure à 100°C. Elles sont ensuite inoculées après refroidissement à 80° C avec le starter . Le taux d'inoculum est calculé de sorte à atteindre l'équivalent de 10⁶ spores/g de nétéu à fermenter. A la suite de l'inoculation, les graines sont mises dans des sacs en polypropylène, au moyen de casier agricole à raison de 10kg de graines. Ces graines sont mises à fermenter dans une chambre à fermentation pendant 72 heures à la température de 30°C.

III- 2: Suivi de la température

Durant la fermentation des cotylédons cuits de *Parkia biglobosa*, les mesures de température sont effectuées automatiquement à des intervalles de temps bien déterminés, grâce à des thermoboutons programmés dans l'ordinateur puis placés à l'intérieur des graines en cours de fermentation. Les mesures sont effectuées toutes les 10 minutes. Un autre thermoboutons est placé dans l'étuve et sert de témoin .

CHAPITRE IV : METHODES D'EXTRACTION DES HYDROLYSATS

L'extraction des hydrolysats s'est effectuée de deux manières :

Sur le nétéu frais aussitôt après 72 heures de fermentation , et sur le même produit après 72 heures de séchage sous le soleil.

Les conditions d'extraction sont décrites ci-dessous

IV- 1: Extraction des hydrolysats du nététu frais

Pour cela 5 kg de nététu frais sont pesés et introduits dans 5L de l'eau filtrée. Après 10 minutes d'agitation à l'aide d'une turbine à pales perforés pour liquide visqueux, les hydrolysats sont recueillis à travers une étamine avant d'être stabilisé selon les méthodes décrites ultérieurement.

IV –2: Extraction des hydrolysats du nététu sec

Dans ce deuxième type d'extraction, les graines fermentées pendant 72h sont mises à sécher pendant 3jours. Après séchage, 2 kg de nététu sont pesés puis introduits dans 8L d'eau filtrée chauffée préalablement à la température de 50°C. On agite pendant 10 mn, suivant le même principe de récupération des hydrolysats du nététu frais.

Dans tous les cas les hydrolysats récupérés sont décantés et filtrés à l'aide d'une centrifugeuse à bol de type Westfalia à 15 000 tr/mm.

CHAPITRE V: METHODES DE STABILISATION DES HYDROLYSATS

Les hydrolysats sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 1 heure après addition de sel à des concentrations différentes.

V-1: Stabilisation des hydrolysats du nététu sec

Les hydrolysats du nététu sec sont stabilisés par autoclavage à 121°C pendant une heure après addition de NaCl à hauteur de 10%, 15%, 20% et 30% (poids/volume). Une partie de ces hydrolysats n'est ni stérilisée ni salée et servira de témoins pour les études de stabilité microbiologique.

V-2: Stabilisation des hydrolysats du nététu frais

Les extraits du nététu frais sont également stérilisés par autoclavage et par addition de NaCl selon les conditions décrites ci-dessus.

Dans les deux cas ,des analyses microbiologiques permettront de juger sur la stabilité des produits.

CHAPITRE VI : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES HYDROLYSATS STABILISES DU NETETU FRAIS ET DU NETETU SEC.

Après autoclavage à 121°C pendant 1 heure et refroidissement, les flacons hermétiquement fermés sont incubés à la température ambiante pendant 4 mois. Après quoi les hydrolysats contenus dans les flacons sont soumis à des analyses microbiologiques pour conclure sur leur stabilité. Pour effectuer ces analyses 0.1 ml est prélevé à l'aide d'une micropipette dans les flacons ayant des teneurs de sel différentes (10%, 15% , 20% et 30%), dans le flacon non autoclavé et sans sel et dans le flacon autoclavé sans sel . L'ensemencement est effectué sur des boîtes de pétri contenant le milieu YGLA stérile. Ces analyses nous permettent de porter un jugement sur la stabilité microbiologique des hydrolysats.

CHAPITRE VII : ANALYSES BIOCHIMIQUES DES HYDROLYSATS

Les analyses biochimiques ont été effectuées sur les hydrolysats jugés stables après addition de sel et stérilisation. Elles portent essentiellement sur les protéines, la matière grasse, les sucres totaux, l'extrait sec, les cendres et certains éléments minéraux (calcium, magnésium, fer, zinc, potassium et cuivre)

VII-1: Détermination de la Teneur en protéines des hydrolysats issus du nétéu frais et des hydrolysats issus du nétéu sec

La teneur des protéines des hydrolysats issus du nétéu frais et des hydrolysats provenant du nétéu sec a été déterminée par la méthode classique de Kjeldhal.

Elle consiste à transformer les composés organiques azotés des hydrolysats en sulfate d'ammonium par l'acide sulfurique concentré et chaud en présence d'un catalyseur (sulfate de cuivre)

La distillation permet de déplacer l'ion ammoniacal (NH_4^+) par la soude NaOH en ammoniac (NH_3). Puis on le piège dans l'acide sulfurique (H_2SO_4) en excès à 0,1N. Ensuite l'excès de l'acide est dosé par une solution de soude 0,1N. Le calcul se fait par différence du volume versé pour le blanc à celui de l'échantillon (**AOAC, 1995**).

Pour déterminer la teneur des protéines contenues dans les hydrolysats du nétéu par la méthode Kjeldhal, deux échantillons sont utilisés dont l'un vient des hydrolysats issus du nétéu frais et l'autre des hydrolysats du nétéu sec . Au niveau de chaque échantillon 0.5 ml sont prélevés et destinés dans un premier temps à être minéralisés. Pour cela des tubes Büchi de minéralisation sont utilisés dans lesquels sont introduits 0.5 ml d'hydrolysats, ensuite une pincée du catalyseur Kjeldhal puis 15 ml d'acide sulfurique concentré. Le tout est placé sur le bloc minéralisateur et on met en marche la hotte pendant 1 heure jusqu'à disparition totale des vapeurs blanches sulfureuses. Ensuite on refroidit.

Après refroidissement suit dans un deuxième temps la distillation des hydrolysats. Pour cela quatre erlenmeyers sont utilisés contenant chacun 20 ml d'acide sulfurique et quelques gouttes d'hélianthine comme indicateur coloré. Les tubes Büchi contenant les hydrolysats minéralisés sont mis dans l'appareil Kjeldhal Büchi après avoir dilué le contenu avec de l'eau distillée .Ensuite le robinet de l'appareil Kjeldhal est ouvert et la lessive de soude est ajoutée. Ainsi commence la distillation et se termine par arrêt automatique de l'appareil. Une fois la distillation terminée, le distillat recueilli jusqu'à volume égal à 200 ml et l'excès d'acide est dosé par la soude 0.1

Les résultats sont obtenus en appliquant la formule ci- dessous

$$\% \text{ en protéines} = \frac{(V_2 - V_1) \times N \times 0.014 \times 100 \times F}{PE}$$

N= normalité de la solution

PE

V₁= Volume d'acide titré utilisé

V₂= Volume utilisé pour le blanc

PE= la prise d'essai en g ou en ml

F = Facteur dépendant de la matière à analyser (ici F = 6.25)

VII – 2 : Détermination du taux de cendres des hydrolysats issus du nététu frais et des hydrolysats issus du nététu sec

Il consiste à déterminer la teneur en cendres des hydrolysats par la méthode du rapport entre la masse incinérée (après four) et la prise d'essai (AOAC, 1995).

Pour effectuer la détermination du taux des cendres des hydrolysats quatre creusets vides de silice sont utilisés ensuite placés dans le four à 550°C pendant 30 mn pour les sécher. Après séchage, les creusets sont mis dans le dessiccateur pour être refroidis. Ensuite on pèse les creusets à l'état vide pour déterminer leur masse (M₁).

Dans les deux premiers creusets sont introduits 5 ml de chaque, des hydrolysats issus du nététu frais et dans les deux autres 5 ml d'hydrolysats issus du nététu sec. Ceci donne la masse (M₂). Les hydrolysats sont calcinés à 450°, ensuite placés dans le four à 550°C jusqu'à l'obtention de cendres blanches (environ 4 heures). Un fois les cendres obtenues, elles sont refroidies dans le dessiccateur et les creusets sont pesés de nouveau avec une balance de type Sartorius de précision 0.001. Ceci donne la masse (M₃).

L'expression des résultats est donnée selon la formule ci – dessous

$$\text{Cendres (\%)} = \frac{(M_3 - M_1) \times 100}{(M_2 - M_1)}$$

M₁ = masse du creuset vide

M₂ =masse du creuset vide + échantillon

M₃ = masse du creuset vide + cendres

VII – 3 : Détermination du taux de matière grasse des hydrolysats issus du nététu frais et des hydrolysats issus du nététu sec

Le principe est basé sur la libération des lipides par une méthode d'extraction utilisant le n-hexane p.a. Cette extraction est suivie par l'évaporation du solvant. Ensuite l'extrait lipidique est pesé après dessiccation à 105°C puis rapporté par rapport à la masse de l'échantillon donnant le taux de matière grasse contenu dans le produit (AOAC, 1995).

Pour déterminer le taux de matière grasse contenue dans les hydrolysats, quatre gobelets vides sont utilisés et pesés après lavage et séchage (M₁). A l'aide d'une éprouvette 70 ml d'hexane sont introduits dans les ballons d'extraction. Après deux cartouches contenant chacune 10 ml d'hydrolysats issus du nététu frais et deux autres cartouches avec chacune 10 ml d'hydrolysats issus du nététu sec sont adaptés au niveau de l'appareil de Soxtec.

Ensuite on plonge les cartouches dans les gobelets d'extraction. L'appareil de Soxtec est mis en marche pendant 30 à 40 mn en position basse puis 15 mn en position haute. Après évaporation de l'hexane des gobelets en y barbotant de l'air, on les retire et les porte à l'étuve à 105°C pendant 30 mn. A la sortie de l'étuve les gobelets sont mis dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement, puis on les pèse de nouveau (M_2) à l'aide d'une balance de type Mettler (précision : 0.0001).

Les résultats sont exprimés suivant la formule ci-dessous.

$$\% \text{ en lipides} = \frac{(M_2 - M_1) \times 100}{PE}$$

M_1 = Masse des gobelets vides

M_2 = Masse des gobelets avec lipides

PE = Prise d'Essai

VII – 4 : Détermination des sucres totaux dans les hydrolysats issus du nétéu frais et dans les hydrolysats issus du nétéu sec

Les sucres sont dissous dans de l'eau distillée, la solution est hydrolysée avec de l'acide chlorhydrique concentré pour récupérer les sucres qui sont dosés. Les dosages sont effectués selon la méthode de Luff School (**AOAC 95**).

Pour doser les sucres totaux contenus dans les hydrolysats quatre erlenmeyers sont utilisés dont les deux premiers contiennent 5 ml d'hydrolysats issus du nétéu frais et les deux autres 5 ml d'hydrolysats issus du nétéu sec. Ensuite on les place dans l'eau froide pendant 1 heure puis dans un bain – marie à 60°C pendant 15 mn. A leur sortie du bain –marie les erlenmeyers sont refroidis et on les complète à 100 ml avec de l'eau distillée. Après les hydrolysats sont filtrés. A la suite de la filtration, on prend 30 ml de ce filtrat issu de chaque hydrolysats et on y ajoute 5 ml d'acide sulfurique concentré et l'hydrolyse est effectuée entre 60 et 70°C pendant 15 mn. La solution obtenue après hydrolyse est neutralisée avec de la lessive de soude, en présence de phénophtaléine puis décolorée avec l'acide chlorhydrique 0.1 N et est complétée à 50 ml de l'eau distillée. Dans un ballon, sont introduits 5 ml de cette solution et 5 ml de réactif de Luff-School et on l'adapte au réfrigérateur pendant 5 mn. Après refroidissement 3 ml de KI à 30 % et 3 ml d'acide sulfurique 6 N sont ajoutés, ensuite le titrage est effectué avec une solution de thiosulfate 0.1 N en présence d'empois d'amidon, soit V_1 le volume de l'échantillon. Un essai blanc est également fait dans les mêmes conditions soit V_2 le volume blanc.

Les résultats sont exprimés en établissant à l'aide de la table chimique la quantité de glucose en mg correspondant à la différence entre les volumes des deux titrations ; exprimés en ml de thiosulfate de sodium 0.1 N.

L'expression des résultats en % de l'échantillon est donnée suivant la formule

$$\% \text{ en sucres totaux} = \frac{(V_2 - V_1) \times 50 \times 100 \times 100}{PE \times 5 \times 1000 \times 30}$$

$V_2 - V_1$ différence entre le volume blanc et le volume de l'échantillon.

PE = Prise d'Essai

VII -5 : Détermination des minéraux dans les hydrolysats issus du nétéu frais et dans les hydrolysats issus du nétéu sec : fer, calcium, magnésium, cuivre, zinc et potassium par spectrophotométrie d'absorption atomique.

Pour l'absorption atomique, l'échantillon est introduit sous forme d'aérosol dans une flamme et il y a vaporisation et atomisation de la majorité des éléments présents.

La loi de Beer Lambert définit le rapport entre la concentration C d'une substance et l'absorbance (référence AOAC, 1995).

$$C = k \log I_0 : I$$

C= concentration

I_0 et I = intensités des sources lumineuses incidente et transmise

k est un facteur dépendant de la substance étudiée.

Pour l'émission de flamme, à la température de la pièce, essentiellement tous les atomes d'un échantillon sont à l'état fondamental. Dans la flamme les atomes peuvent être excités.

Les principales conditions opératoires pour le dosage d'un élément avec le spectrophotomètre sont : la longueur d'onde, la largeur de la fente, la source, le type de flamme

Les solutions standard sont préparées à partir de solutions mères de 1000ppm de concentration.

Les concentrations de ces solutions standard dépendent de l'élément à doser.

Pour la préparation des échantillons, 5 ml d'hydrolysats issus du nétéu frais et 5 ml d'hydrolysats issus du nétéu sec sont prélevés. Puis ils sont calcinés à 500°C en chauffant graduellement pendant 2 heures, ensuite sont laissés refroidir. Toutes les précautions sont prises pour éviter tout contact des échantillons avec des contaminants au niveau du four et à l'extérieur. Les cendres des hydrolysats sont mouillées avec 10 gouttes de l'eau bi-distillée et on ajoute 3 à 4 ml d'acide nitrique^{1/2}. On fait évaporer à sec l'excès d'acide contenu dans les cendres des hydrolysats sur plaque chauffante à 100°C et on les calcine de nouveau pendant 1 heure à 500°C. Les cendres des hydrolysats sont laissés refroidir dans les creusets puis sont dissous dans 10 ml d'acide chlorhydrique^{1/2}. Après elles sont filtrées dans une fiole de 50 ml à l'aide du papier filtre avec plusieurs portions d'eau bi-distillée puis on complète jusqu'au

trait de jauge. Toutes les dilutions et préparations des échantillons sont effectuées avec une solution d'acide nitrique 1%.

Les résultats sont exprimés suivant la formule ci-dessous
Soit **p** la prise d'essai, **C** la concentration

Elément (ppm) = [C] solution finale x facteur de dilution x 50x1000 : px1000.

VII- 6: Détermination de l'extrait sec contenu dans les hydrolysats issus du nététu frais et dans les hydrolysats issus du nététu sec

L'extrait sec des hydrolysats été déterminé en utilisant des capsules en aluminium. Dans huit capsules vides initialement pesées (M_1) avec une balance de type Sartorius de précision 0.001, sont introduits dans les quatre premières 10 ml de chaque, des hydrolysats issus du nététu frais. Dans les quatre autres on introduit 10 ml d'hydrolysats issus du nététu sec (M_2). Les capsules et les hydrolysats sont mis à chauffer à l'aide d'un bain-marie chauffant jusqu'à évaporation totale du liquide. Les capsules et leur contenu sont de nouveau pesés (M_3).

L'expression des résultats est donnée selon ci- dessous

$$\text{Extrait sec en \%} = \frac{(M_3 - M_1) \times 100}{(M_2 - M_1)}$$

M_1 : Masse des capsules vides

M_2 : Masse des capsules + échantillon avant évaporation

M_3 : Masse des capsules + échantillon après évaporation

CHAPITRE VIII : DETERMINATION DE LA MATIERE SECHE SOLUBLE DANS LES HYDROLYSATS ISSUS DU NETETU FRAIS ET DANS LES HYDROLYSATS ISSUS DU NETETU SEC

Pour déterminer la quantité de matière sèche dissoute dans les hydrolysats on a utilisé un réfractomètre gradué de 0 à 32°B. Les brix des hydrolysats sont lus en tenant compte de leurs différentes concentrations en NaCl allant de 0, 10, 15, 20 à 30 %.



RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS

I : FORMULATION DU STARTER

La flore totale et la flore sporulée ont été évaluées lors de la formulation du starter du *Bacillus subtilis*. Les résultats consignés sur le tableau I.1 ont été déterminés selon la méthode décrite dans la partie Matériels et Méthode (chapitre II § II-2)

Tableau I-1 : Comptage de la flore totale et de la flore sporulée lors de la formulation du starter du *Bacillus subtilis*

ETAPES	FLORE TOTALE (UFC/G)	FLORE SPORULEE (UFC/G)
Etape 1 24 h de fermentation	$4,0.10^8$	CNE
Etape 2 48 h de fermentation	$3,0.10^{10}$	$3,3.10^8$
Etape 3 72 h de fermentation	CNE	$2,2.10^{11}$

CNE: Comptage

Non Effectué

Le tableau I-1 montre que durant les premières 24 heures de fermentation, la flore totale est de $4,0.10^8$ ufc/g. Pendant les premières 48 heures de fermentation on obtient respectivement pour la flore totale et celle sporulée $3,0.10^{10}$ ufc/g et $3,3.10^8$ ufc/g . Dans la troisième étape, seul le comptage des spores a été effectué et on obtient $2,2.10^{11}$ ufc/g.

II : FERMENTATION DES GRAINES DE *PARKIA BIGLOBOSA*

II-1: Fermentation des cotylédons de *Parkia biglobosa*

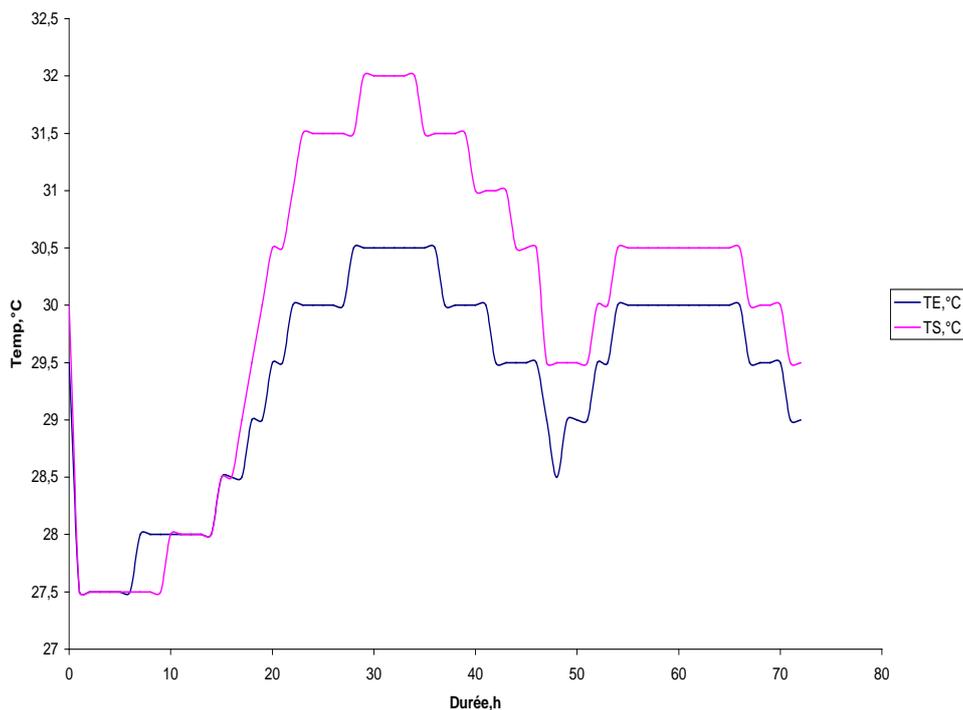
Les graines fermentées selon la technique décrite dans la partie Matériel et Méthodes (chapitre III § III- 1) montrent : une couleur brune au niveau des graines, différemment de la couleur initiale qui était jaune claire (Photo 1: boîte à droite) . Nous remarquons un fort dégagement ammoniacal durant la fermentation. Les graines sont très molles et donnent l'arôme caractéristique de nétéu.



Photo 1: De gauche à droite : graine entière de *Parkia biglobosa*, cotylédons de *Parkia biglobosa* et le nétéu.

II- 2 Suivi de la température

Lors de la fermentation des cotylédons de *Parkia biglobosa* l'évolution de la température est suivie aussi bien dans l'étuve que dans les cotylédons en fermentation. Les résultats obtenus selon la technique décrite dans la partie Matériels et Méthode (chapitre III § III- 2) sont consignés sur le graphe II-2-1



Grphe II-2-1: Evolution des températures des cotylédons de *Parkia biglobosa* et de l'étuve pendant la fermentation

Après leur incubation dans l'étuve à la température initiale 30°C, les cotylédons fermentés de *Parkia biglobosa* voient leurs températures diminuer de 27.5°C dès la 2^{ème} heure. Elles se maintiennent ainsi jusqu'à la 8^{ème} heure. C'est à partir de la 10^{ème} heure qu'elles commencent à augmenter de 28°C pour atteindre un maximum 32°C à la 34^{ème} heure. Elles demeurent ainsi constantes pendant quatre heures et ce n'est qu'à partir de la 36^{ème} heure que les températures diminuent de nouveau pour atteindre un minimum 29.5°C à la 72^{ème} heure. Au niveau de l'étuve à moins d'une heure la température diminue jusqu'à la 6^{ème} heure. C'est à partir de la 8^{ème} heure que l'étuve commence à chauffer pour atteindre un maximum 30.5°C à la 28^{ème} heure et se maintient pendant cinq heures. A la 36^{ème} heure, elle se refroidit pour atteindre un minimum 29°C à la 72^{ème} heure. Nous remarquons que les températures régnantes dans l'étuve ont tendance à suivre l'allure de celles des cotylédons fermentés, mais elles sont moins intenses.

III : STABILISATION DES HYDROLYSATS DU NETETU

III-1 Stabilisation des hydrolysats du nététu frais

Les hydrolysats issus du nététu frais ont été stabilisés suivant la technique décrite dans la partie Matériel et Méthodes (chapitre V § V-1).

Après extraction, centrifugation et stérilisation des hydrolysats plusieurs constats ont été notés. En effet, à la suite d'une centrifugation au moyen d'un appareil de type westfalia à 15.000 tr/mn, les hydrolysats issus du nététu frais sont clairs et limpides. Aucun dépôt n'a été noté au fond des flacons. Mais après autoclavage à

121°C pendant 1heure, nous avons noté un fractionnement du liquide qui est matérialisé par un dépôt solide et un liquide clair et limpide qui le surmonte (Photo 2).



Photo 2: Hydrolysats issus du Nététu Frais avec un dépôt solide surmonté par un liquide clair et limpide

Avant la stérilisation et tout juste après centrifugation, les hydrolysats sont jaunâtres mais après l'autoclavage à 121°C pendant 1heure, ils donnent une couleur qui tire vers le marron. Nous notons également une odeur aromatique caractéristique aux arômes de nététu. Au 47^{ème} jour après la stabilisation des hydrolysats du nététu frais, nous avons noté un épaissement des hydrolysats au niveau des flacons qui est proportionnel aux teneurs du NaCl introduites.

III -2 stabilisation des hydrolysats issus du nététu sec

Dans les hydrolysats issus du nététu sec, après stérilisation à 121°C pendant 1heure et ajout de NaCl à des teneurs différentes allant de 10, 15, 20, à 30%, aucun dépôt n'a été noté au niveau des flacons. La couleur des hydrolysats est marron et homogène. Dans le flacon non stérilisé et non salé l'hydrolysat est trouble alors qu'avant il était limpide et clair. (Photo 3)



Photo 3: Hydrolysats trouble issu du Nététu Sec non stérilisé et sans sel.

Au 34^{ème} jour après leur stabilisation les hydrolysats contenus dans les flacons sont épais et donnent une couleur marron plus foncée que celle de départ. Cet épaissement augmente avec la quantité de NaCl introduite. Dans les flacons on commence à noter un dépôt solide. (Photo 4)



Photo 4: Hydrolysat issu du Nététu Sec avec un dépôt solide au 34^{ème} jour

IV : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES HYDROLYSATS STABILISES DU NETETU SEC ET DU NETETU FRAIS

Des analyses microbiologiques qualitatives des hydrolysats stabilisés de nététu frais et de nététu sec ont été effectuées selon la technique décrite dans la partie Matériels et Méthodes (chapitre VI). Le tableau IV -1 et le tableau IV -2 donnent respectivement les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les hydrolysats du nététu sec et sur les hydrolysats du nététu frais après 4 mois d'incubation à la température ambiante.

Tableau IV -1: Analyse microbiologique des Hydrolysats issus du Nététu Sec (HNS)

Echantillons	Présence ou Absences de spores de <i>Bacillus subtilis</i>
HNS nst ss	+
HNS st ss	+
HNS st/10%	-
HNS st/15%	-
HNS st/20%	-
HNS st/30%	-

HNS nst ss: Hydrolysats issus du Nététu Sec non stérilisés et sans sel

HNS st ss: Hydrolysats issus du Nététu Sec stérilisés sans sel

#: teneur en sel dans l'hydrolysat

+ : Présence de spores de *Bacillus subtilis*

-: Absence de spore de *Bacillus subtilis*

Les résultats du tableau IV -1 montrent la présence des spores dans les hydrolysats issus du nététu sec non stérilisés et sans sel et dans les hydrolysats issus du nététu sec stérilisés sans sel. Dans les flacons contenant des concentrations différentes de sel (10, 15, 20 et 30%) les spores sont absentes.

Tableau IV -2: Analyse microbiologique des Hydrolysats issus du Nététu Frais (HNF)

ECHANTILLONS	PRESENCE OU ABSENCE DE SPORE DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i>
HNF nst ss	+
HNF st ss	-
HNF st/10%	-
HNF st/15%	-
HNF st/20%	-
HNF st/30%	-

HNF nst ss: Hydrolysats issus du Nététu Frais non stérilisés et sans sel

HNFst ss: Hydrolysats issus du Nététu Frais stérilisés sans sel

%; teneur en sel dans l'hydrolysate

+ : Présence de spores de *Bacillus subtilis*

-: Absence de spore de *Bacillus subtilis*

Le tableau IV- 2 montre la présence des spores dans les hydrolysats non stérilisés et sans sel. Alors que dans les autres flacons contenant les hydrolysats stérilisés sans sel et les hydrolysats ayant des concentrations différentes de sel (10, 15, 20 et 30%) les spores sont absentes.

V : ANALYSES BIOCHIMIQUES DES HYDROLYSATS

Le tableau V-1 et le tableau V-2 donnent respectivement la composition biochimique des hydrolysats issus du nétéu sec et des hydrolysats issus du nétéu frais obtenue selon les techniques décrites dans la partie matériel et méthodes (chapitre VII § VII -1, VII- 2 , VII- 3 ,VII- 4 ,VII- 5 et VI- 6)

Tableau V-1: Composition biochimique en moyennes des hydrolysats du nétéu sec

ECHANTILLON	HYDROLYSATS ISSUS DU NETETU SEC
CONSTITUANTS POUR 100G DE MATIERE SECHE	
Protéines (g)	4,32
Matières grasses (g)	0,03
Sucres totaux (g)	0,30
Extraits secs (g)	11,73
Cendres + sel (g)	17,44
Calcium (mg)	16,84
Magnésium (mg)	45,05
Fer (mg)	18,59
Zinc (mg)	nd
Potassium (mg)	nd
Cuivre (mg)	nd

nd: non détecté

Le tableau V-1 montre la présence des protéines, de la matière grasse, des sucres totaux, du calcium, du magnésium et du fer avec respectivement 4,32%, 0,03%, 0,30%, 16,84 mg/100g, 45,05 mg/100g, et 18,59 mg/100g . Dans les hydrolysats issus du nétéu sec les résultats donnent 11,73% d'extrait sec et 17,44% de sel plus cendres. Le cuivre, le zinc et le potassium ne sont pas détectés dans les hydrolysats.

Tableau V-2: Composition biochimique en moyennes des hydrolysats issus du nétéu frais

ECHANTILLON	HYDROLYSATS ISSUS DU NETETU FRAIS
CONSTITUANTS POUR 100g DE MATIERE SECHE	
Protéines (g)	4,95
Matières grasses (g)	0,02
Sucres totaux (g)	0,29
Extraits secs (g)	10,40
Cendre s+ sel (g)	18,00
Calcium (mg)	19,52
Magnésium (mg)	49,90
Fer (mg)	18,26
Zinc (mg)	nd
Potassium (mg)	nd
Cuivre (mg)	nd

nd: non détecté

Les résultats montrent que les hydrolysats issus du nétéu frais contiennent des protéines de la matière grasse des sucres totaux ,du calcium, du magnésium et du fer avec respectivement 4,95% 0, 02%, 0,29%, 19,52 mg/100g, 49,90 mg/100g et 18,26 mg/100g. Dans les hydrolysats du nétéu frais, nous avons 10,40% d'extrait sec et 18,00% de sel plus cendres. Par contre le zinc, le cuivre et le potassium ne sont pas détectés dans les hydrolysats issus du nétéu frais

VI : DETERMINATION DE LA MATIERE SECHE SOLUBLE DANS LES HYDROLYSATS ISSUS DU NETETU FRAIS ET DANS LES HYDROLYSATS ISSUS DU NETETU SEC

Les tableaux VI- 1 et VI - 2 donnent respectivement la quantité de matière sèche soluble des hydrolysats issus du nététu frais et des hydrolysats provenant du nététu sec selon les techniques décrites dans la partie Matériel et Méthodes (chapitre VIII)

Tableau VI- 1 : Matière sèche soluble en moyenne des Hydrolysats issus du Nététu Frais(HNF) en °Brix

HYDROLYSATS	HNFNST SS	HNFST SS	HNFST/10%	HNFST/15%	HNFST/20%	HNFST/30%
°Brix	7	7	17	21	24	27.9

HNFst ss : Hydrolysats issus du Nététu Frais stérilisés sans sel

HNFst : Hydrolysats issus du Nététu Frais stérilisé

HNFnst ss: Hydrolysats issus du Nététu Frais non stérilisé et sans sel

% : Indique le pourcentage de NaCl introduit dans les hydrolysats

Tableau VI-2 Matière sèche en moyenne des Hydrolysats issus du Nététu Sec (HNS) en °B

HYDROLYSA	HNS NST SS	HNS ST SS	HNSST /10%	HNSST /15%	HNSST /20%	HNSST /30%
TS						
°Brix	7.1	7.1	17.3	21	25	28

HNS nst ss : Hydrolysats issus du Nététu Sec non stérilisés sans sel

Les résultats de ces deux tableaux montrent que la quantité de matière sèche soluble augmente avec la teneur du NaCl introduite dans les hydrolysats. Ainsi dans les hydrolysats non stérilisés et sans sel et dans les hydrolysats stérilisés sans sel, on trouve la même quantité de matière sèche soluble soit 7.1°B pour les hydrolysats du nététu sec et 7°B pour les hydrolysats du nététu frais. C'est à partir des hydrolysats avec leurs teneurs différentes de sel (10, 15, 20 et 30%) qu'on note la variation de la quantité de matière sèche soluble dans les hydrolysats du nététu sec et frais (tableau VI-1 et tableau VI -2).

DISCUSSIONS

Les spores de *Bacillus subtilis* augmentent avec la durée de la fermentation et sont stables. Dans le starter 1 nous avons 10^{11} ufc/g et cette même densité se retrouve approximativement dans le starter 2 soit $2.2 \cdot 10^{11}$ ufc/g.

Après trempage et cuisson, les cotylédons de *Parkia biglobosa* sont mous et favorisent le développement des microorganismes responsables de la fermentation. Ces bactéries, pendant la fermentation sécrètent des enzymes extra cellulaires qui assurent la transformation biochimique des macromolécules (Odufa, 1985). Ces dégradations au niveau du substrat seraient à l'origine des changements d'aspect au niveau des graines. Le *Bacillus subtilis* sécrètent des protéases qui hydrolysent les protéines à des constituants plus petits, que sont les acides aminés. Le produit final de l'hydrolyse protéique est le NH_3 , ce qui expliquerait l'odeur ammoniacale qui se dégage lors de la fermentation solide.

L'abaissement des températures des graines dès les premières vingt et quatre heures de fermentation, correspondrait à la phase de latence de *Bacillus subtilis*. C'est la phase pendant laquelle les bactéries inoculées s'adaptent au nouveau milieu dans lequel elles se trouvent et utilisent les réserves nutritives nécessaires à leur croissance comme le glucose présent dans les graines. Après avoir épuisé ces réserves nutritives, le milieu, leur devient défavorable et les bactéries sporulent. A ce moment *Bacillus subtilis* attaque les protéines pour tirer l'azote nécessaire à sa survie. Cette attaque des protéines se manifeste par une forte activité métabolique du substrat, ce qui expliquerait l'augmentation de la température des graines. Cette augmentation de la température des graines crée des conditions favorables à la protéolyse des graines par les protéases de *Bacillus subtilis*. Cette protéolyse entraîne des transformations biochimiques au niveau des cotylédons de *Parkia biglobosa* (Odufa, 1985). Une fois le substrat épuisé, l'activité protéolytique de *Bacillus subtilis* diminue ce qui explique l'abaissement de la température des graines à partir de la trente et sixième heure jusqu'à la soixante et douzième heure. Ceci est confirmée par les études d'Omafuvbe et al (2000) sur l'activité optimale des enzymes protéiques de *Bacillus subtilis* lors de la fermentation du dawadawa. Selon ces auteurs l'activité des protéases de *Bacillus subtilis* atteint son optimum à la trente et sixième heure de fermentation. L'évolution de la température de l'étuve qui suit l'allure des températures des graines fermentées s'expliquerait par l'exothermie de la fermentation des cotylédons du caroubier africain (Antai et Ibrahim, 1986).

Nous pouvons donc conclure que les changements observés sur les graines de *Parkia biglobosa* fermentés sont fonction de l'activité des microorganismes notamment des enzymes qu'ils sécrètent.

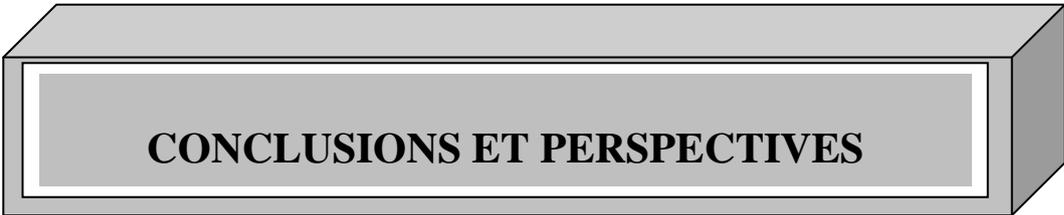
Le dépôt solide observé dans les hydrolysats du nétéu frais après autoclavage et dans ceux du nétéu sec au 34^{ème} jour pourrait s'expliquer par une précipitation des protéines. En effet, certaines protéines précipitent au contact des électrolytes notamment les sels neutres et en présence de la chaleur.

Les sels neutres interviennent à la précipitation des protéines en fonction de leur concentration et de la charge des ions c'est-à-dire de la force ionique. A faible force ionique, on observe un effet dissolvant tandis qu'à force ionique élevée au contraire, on assiste au relargage, c'est à dire à la précipitation des molécules protéiques. Toutes les protéines ne sont pas également sensibles à cet effet de relargage par addition d'un sel neutre ; ainsi certaines protéines précipitent dans une solution à demi saturée, d'autres seulement lorsque la solution est à 50 ou 60% saturée (Biochimie Générale). Ainsi la précipitation augmente en fonction de la teneur du NaCl dans les hydrolysats du nétéu. Le dépôt observé dans les hydrolysats pourrait aussi s'expliquer par le fait qu'à l'issue de la centrifugation il reste encore des corps solides dans les exsudats et à la suite du repos du liquide ils se déposent. Nous pouvons également expliquer le dépôt solide par les cristaux du sel qui proviendraient de la dissolution non totale du NaCl.

La chaleur et le sel interviennent dans le caractère organoleptique des exsudats. En effet l'odeur agréable du nétéu augmente avec la quantité de NaCl introduite dans les hydrolysats comme en témoignent les hydrolysats non stérilisés et sans sel qui dégagent une odeur nauséabonde qui serait due à une putréfaction des protéines par les spores de *Bacillus subtilis*, contrairement aux hydrolysats stérilisés et contenant 20% de sel dont l'odeur est agréable et alléchante. L'épaississement observé au niveau des hydrolysats est dû aux teneurs du sel. Ceci pourrait s'expliquer par les mesures réfractométriques qui mettent en évidence la variation de la quantité de matière sèche soluble dans les hydrolysats suivant les teneurs différentes de sel (tableau VI-1 et tableau VI-2).

Les spores de *Bacillus subtilis* à une teneur élevée de NaCl et à une forte température (121°C), sont détruites (tableau IV-1 et tableau IV- 2). Ceci explique l'absence des spores dans les hydrolysats autoclavés et salés. La présence de spores dans les hydrolysats stérilisés et sans sel issus du nétéu sec, s'expliquerait par la résistances de certaines spores à l'autoclavage et du fait de l'absence du sel, elles se développent. En effet le sel agit en inhibant le développement des spores. Les spores de *Bacillus subtilis* présentes dans les hydrolysats non autoclavés et non salés proviennent de l'inoculum servant de fermentation des cotylédons.

L'étude du point de vue composition biochimique des hydrolysats a montré malgré les méthodes d'extraction qui diffèrent, la possibilité d'obtenir deux produits intéressants au plan nutritionnel provenant du nétéu. Ces deux produits sont les hydrolysats issus du nétéu sec et les hydrolysats issus du nétéu frais. Ainsi se trouvent dans ces hydrolysats les protéines, la matière grasse, les sucres totaux, du calcium, du magnésium et du fer (tableau V-1 et tableau V-2). Par contre le cuivre, le zinc et le potassium sont absents. L'absence du cuivre et du zinc n'est pas en conformité avec les études effectuées sur les cotylédons cuits de *Parkia biglobosa* et sur le nétéu. Ainsi il a été trouvé 3.2 mg/100g de cuivre et 7.2 mg/100g de zinc dans les cotylédons cuits de *Parkia biglobosa* (Fétuga et al, 1974). Eka (1980) a montré aussi que la teneur du zinc et du cuivre augmente durant la fermentation des cotylédons de *Parkia biglobosa*. L'absence du cuivre et du zinc pourrait s'expliquer aussi par une extraction insuffisante lors de la manipulation ou par un problème technique de l'appareil analyseur.



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a permis de montrer que nous pouvons obtenir un starter de *Bacillus subtilis* à partir d'une souche M4. Ce starter est stable et est capable d'assurer la fermentation des cotylédons de *Parkia biglobosa*. Cette fermentation se déroule à la température de 30° C favorable pour une bonne activité protéolytique du *Bacillus subtilis* (Mame Seynabou Kane, 2003).

A partir de ces cotylédons fermentés par le *Bacillus subtilis* nous obtenons un produit riche en protéines (Fetuga et al, 1974). Cette étude a également permis de conclure sur les possibilités d'obtenir des arômes liquides à partir de produits naturels et ceci par des méthodes simples. Ces extraits une fois bien valorisés permettraient de mettre fin à la prolifération de certains produits aromatiques d'origine douteuse. Ceci ne serait possible que par une bonne promotion du produit. Ces hydrolysats issus du nététu peuvent être stabilisés à 121° C pendant 1 heure et par ajout de sel 20% et conservés à la température ambiante plus de 4 mois.

L'analyse biochimique des hydrolysats issus du nététu frais et du nététu séché a montré leur richesse en éléments nutritifs tels que les protéines, le fer, le calcium et le magnésium. Ces éléments ont un rôle important au plan nutritionnel. .

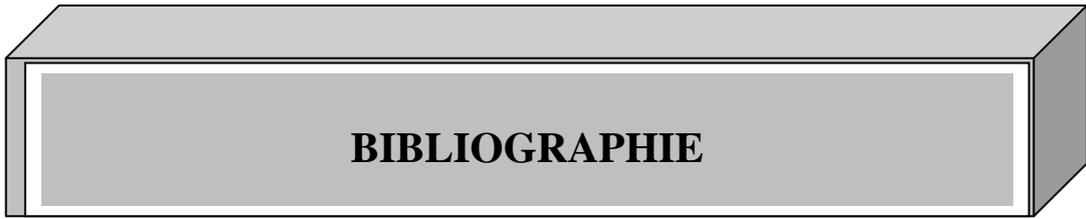
Ainsi pour la suite du travail de larges perspectives sont envisageables en vue de donner aux hydrolysats du nététu une grande valeur au plan nutritionnel. Tout d'abord il est nécessaire :

- D'optimiser une méthode d'extraction des hydrolysats du nététu par l'utilisation d'une bactérie très performante dans la fermentation des cotylédons de *Parkia biglobosa*;
- De déterminer la teneur exacte de chaque acide aminé contenue dans les hydrolysats par la spectrophotométrie ;
- De déterminer les substances volatiles dans les hydrolysats du nététu selon les techniques de chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrophotométrie de masse (CG / SM)
- De déterminer les vitamines contenues dans les hydrolysats par des méthodes chromatographiques ;
- D'étudier la composition biochimique des hydrolysats en parallèle avec un témoin ;
- De stabiliser les hydrolysats en prenant des indicateurs mesurables de la stabilisation

- De déterminer le degré d'hydrolyse des protéines pour éviter l'amertume dans le produit fini;
- D'étudier économiquement la rentabilité des hydrolysats en partant du coût de la matière première jusqu'au produit fini.

Dans le cadre de la maîtrise des saveurs il faudrait approfondir les connaissances :

- Sur les grands groupes de molécules (pyrazines, produits soufrés) dans les hydrolysats ;
- Sur le métabolisme microbien : ceci permettra de promouvoir l'utilisation de microorganismes (en association ou non) pour la production d'arômes ;
- Sur les mécanismes conduisant aux composés aromatiques



BIBLIOGRAPHIE

- Addy E.O.H, Salamil L.I., Igboelli L, Rewama H.S (1995). Effect of processing on nutrient composition and anti-nutritive substances of African locust bean (*Parkia filicoidea*) and baobab sees (*Adansonia digitata*). *Plants Foods for Hum. Nutr.* 48: 113-117.
- Adebisi M. B., Fetuga B.L., 1986. Chemical composition of some under exploited leguminous crop seeds in Nigeria. *J. Agric. Food Chem.* 34; 189-192
- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Patricia Cunnif, 6th ed., Virginia
- Arai S. , Yamashita K., Fujimaki M., 1975. Plastein reaction and its application . *Cereal Foods World* , 20 , 107-112.
- Barzana E., Garcia -Garibay M., 1994. Production of fish protein concentrates dans: *Fisheries processing*, Martin A.M. ed., pp 206-222, Chapman et Hall , London
- Berger R.G. ,1995 . *Aroma Biotechnology*, 240 p. , Springer , Berlin
- Biochimie Générale, 7^{ème} édition, Masson .J.H.Weil
- Charles Haddad, 2000. *Les Fruitières Sauvages du Sénégal*
- Chassagne D. , Bayonove C. , Crouzet J. , Baumes R. , 1995 . Formation of aroma by enzymic hydrolysis of glycosidically bound compenents of passion fruit , dans: *Bioflavour 95* , Etievant P. , Schreier CP. , eds , pp 217-222, INRA Editions Paris .
- Campbell-Platt, 1980 .*Fermented Food of the World: a Dictionary and Guide*. Ed. Butterworths, London
- Daiwa Kasei K.K. , 1991 . Brevet japonais . jp 03240432 A2 01 1025.
- Durand P., 1982. Etude de la fraction azotée soluble dans l'anchois salé en cours de maturation . *Rev.Trav. Inst Pêches marit.*, 45 , 271-281.
- Eka O.U. 1980. Effect of fermentation on the nutrient status of locust bean. *Food Chem.* 5: 303-308.
- Enzymes en Agroalimentaire V. Larreta -Garde (coordonnateur) collection sciences et techniques agroalimentaires
- Fetuga B.L., Babattunde G.M., Oyenuga V.A. 1974. Protein quality of some unusual protein foods stuff. *Studies on the African locust bean seed (Parkia filicoidea)*. *Br. J. Nutr.* 32: 27-37.
- Grosch W. , Zeiler -Hilgart G. , 1992. Formation of meatlike flavor compounds, dans : *Flavor precursors* , Teranishi R., Takeoka G. , Gunthert M., eds pp 183-192 A.C. S. ,Symp. ser . 490, Washington D.C.
- Hewitt E.J. , Mackay , D.A.M. , Konigsbacher K.S., Hasselstrom T., 1956. The role of enzymes in food flavors . *Food Technol .* , 10 487-489

Ibrahim M.H., Antai S.P. 1986. Chemical changes during the fermentation of african locust bean (*Parkia filicoidea*) seeds for production of dawa-dawa. *Qualitas Plantarum. Plant Food for Hum. Nutr.* 36 (3): 179-184.

Ikenebomeh. M.J., Kok R., Ingram J.M. 1986. Processing and fermentation of the african locuste bean (*Parkia filicoidea*) to produce dawa-dawa. *J. Sci. Food and Agric.* 37 (3): 273-282

Jideani I.A.O., Okeke C.R. 1991. Comparative study of microorganisms and sensory attributes of condiments from the fermentation of differents seeds. *Plants foods for Hum. Nutrition.* 41 (1): 27-37.

Kerharo J. 1974. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plante médicinales et toxiques. Ed. VIGOT et Frères, Paris.

Lee K.L., Lee P.M. Siaw Y. S., Morihara K., 1992. Effects of methanol on the synthesis of aspartame precursor catalysed by *Pseudomonas aeruginosa* elastase . *Biotechnol . Lett.* , 14 779-784.

Lindsay R.C., Rippe J.K., 1986. Enzymatic generation of methanethiol to assist in the flavor development of the Cheddar cheese and other foods , dans : Biogeneration of aromas , Croteau R. , Parliment T. , eds ., pp 286-308, A.C.S. Symp. ser. 317, Washington D.C.

Lockett C.T., Calvert C.C., Grivetti L.E. 2000. Energy and micronutrient composition of dietary and medicinal wild plants consumed during drough. Study of rural Fulani, northeasten Nigeria. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 51 (3): 195-208.

Maarse H. , 1991. Volatile compounds in foods and beverages, 764 p. Marcel Dekker, Inc. , New York.

Mackie I.M., 1982. General review of fish protein hydrolysates . *Anim.Feed Sci. Tech.*, 7, 113-114

Mame Seynabou Kane, 2003. Contribution à l'optimisation des conditions d'hydrolyse des graines de *Parkia biglobosa*

Ndir, 2002. Caractérisation microbiologique et biochimique du nététu, condiment alimentaire obtenu par fermentation des graines de caroubier africain *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth

Odufa S.A., Komolafe O.B. ,1981. Nutritional characteristics of *Staphylococcus specices* from fermenting african locust bean *Parkia biglobosa*. *Die Nahrung.* 33 (7) :607-615

Odufa S.A.,1983. Carhydrate changes in fermenting locust bean (*Parkia filicoidea*) during iru preparation. *Qual. Plant. Plant Food for Hum. Nutr.*32(1): 3-10

Odufa S.A. Adewuyi E. Y. 1985. Optomization of process conditions for fhe fermentation of african locust bean (*Parkia biglobosa*). II. Effect of starter cultures. *Chem.. Mikrobiol. Technol. Der len.* 9 (4): 118-122.

Odufa S.A.,1985. Biochemical changes in fermenting african locust bean (*Parkia biglobosa*) during iru fermentation. *Journal of Food Technology.*20:295-303

Ogbabu L. J., Okagbue R.N 1988. Fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) seeds. Involvement of different species of *Bacillus*. *Food Microbiol.* 5: 195-199.

Omafuybe B.O., Shokuman O. O., Abiose S.H., 2000. Microbial and Biochemical change in the traditional fermentation of soybean for "soy-daddawa" nigerian food condiment. Food Microbiology. 17: 469-474

Ouédrago A.S. 1995. *Parkia biglobosa* (Leguminosae) en Afrique de l'Ouest: Biosystématique et Amélioration. Thesis, Agricultural University Wageninngen. 250p.

Révérard Père seibire, 1895. Les Plantes au Sénégal

Richard H. , 1992. Epices et aromates , 339 p. , Tec et Doc-Lavoisier, Paris.

Williams P.J., Sefton M.A., Marinos V.A. , 1993 . Hydrolytic flavor release from non volatile precursors in fruits , wines and some other plant-derived foods, dans Recents developments in flavor and fragrance chemistry ,Hopp R., Mori K., eds., pp 283-290 ,VCH , Weinheim.

Wong C.H., Whitesides G.M.,1994. enzymes in synthetic organic chemistry , 370 p. Pergamon

Nom: Diouf

Prénom: André

Mémoire soutenu et présenté le 05 janvier 2005

Sujet : Caractérisation biochimique et stabilisation des hydrolysats issus de la fermentation des cotylédons de *Parkia biglobosa* (Jacq) Benth

DEA Chimie et Biochimie des Produits Naturels

MEMBRES DE JURY

Pr. Abdoulaye Samb: Président du jury Chef du DEA

Dr. Lat Souk Tounkara: Directeur du mémoire Chef Unité Biotechnologie / ITA

Dr. Paul Marie Ngom: Chercheur Laboratoire Chimie / ITA

Résumé

Le caroubier africain (*Parkia biglobosa*) est un arbre de 7 à 20 m de hauteur pouvant atteindre exceptionnellement 30 m. Il appartient à la famille des *Leguminosae* et à la sous famille des *Mimosidae*. *Parkia biglobosa* pousse dans les zones à 600-700 mm de pluie, bien que certaines plantes soient rencontrées dans les zones sèches à 300-400 mm. Il faut 7 à 8 ans pour les premières récoltes et 12 à 15 ans pour que la plante atteigne sa taille définitive. La récolte se fait entre mai juillet. C'est une plante abondante dans la zone sud du Sénégal notamment à Sédhiou.

Les cotylédons de *Parkia biglobosa* obtenus par décorticage sont transformés par fermentation en nétéu, condiment local à grande valeur alimentaire qui fait l'objet d'importantes transactions entre les pays africains. Cette étude a pour objectif de déterminer

les qualités nutritionnelles des hydrolysats issus de la fermentation des cotylédons du néré (*Parkia biglobosa*).

Au terme de cette étude, il est prouvé que le starter 2 de *Bacillus subtilis* est capable de fermenter les cotylédons du néré (*Parkia biglobosa*) pour donner le **néétu**. Il est également montré la possibilité d'extraire les **hydrolysats** de ce néétu par des méthodes simples et d'en faire des arômes liquides. Cette étude a permis aussi la mise en évidence de la stabilisation des hydrolysats par autoclavage à 121°C pendant une heure et par salage. Les caractérisations biochimiques montrent que les hydrolysats issus du néétu frais et du néétu sec sont riches en protéines, en calcium, en magnésium et en fer avec respectivement 4,95% (pds/pds), 19,59 mg/100g, 49,90 mg/100 et 18,26 mg/100g et 4,32%, 16,84 mg/100g, 45,05 mg/100g et 18,58 mg/100g. Dans tous les cas le cuivre, le zinc et le potassium ne sont pas détectés.

Les hydrolysats du néétu sont donc riches en éléments nutritifs et par conséquent seraient très intéressants comme additif alimentaire.

Mots Clés: *Parkia biglobosa*, *Bacillus subtilis*, Fermentation, Néétu, Extraction, Stabilisation, Hydrolysats.

Tel: 8772588 / 5659701 e-mail dioufand@yahoo.fr