

Biodégradation anaérobie des tourteaux de karité

Cheik A. T. OUATTARA*, A. S. TRAORÉ*

Résumé

Le karité est une essence très répandue dans les pays de la zone soudano-guinéenne. L'amande de karité est riche en lipides (environ 50 % p/p). C'est une source de matières grasses pour beaucoup d'activités artisanale et industrielle. (cuisine, fabrication du savon, cosmétique, etc.).

Après extraction du beurre, il reste une importante quantité de tourteau qui constitue un produit polluant pour l'environnement. Sa composition est d'environ 14 % de protéines, 25 % de sucres, 22,5 % de lipides et 20 % de polyphénols, les tannins en particulier. Les tannins sont des composés biologiquement actifs, toxiques pour les animaux à sang froid et possédant des propriétés antimicrobiennes. Les lipides empêchent la diffusion de l'air et de l'eau dans le sol au niveau des sites de dépôts. Ces rejets constituent donc un produit polluant pour l'environnement.

Les essais de biodégradation anaérobie effectués par des fermentations en batch indiquent que la production de méthane à partir des tourteaux s'accompagne d'une importante accumulation d'acides organiques, de tannins, d'ammoniaque et de sulfures dans les milieux à taux de charge élevé. Un degré d'épuration de 90 % environ a été obtenu à partir de 2 % (p/v) de substrat. Un consortium microbien spécifique a été utilisé après une année d'acclimatation.

Mots clés : tourteaux de karité, biodégradation, micro-organismes.

Biodegradation of shea-nut residues

Abstract

Shea-nut has fruits high in oil content (approximately 50 %, wt/wt). These trees are found in soudano-guinean area. They provide shea-nut butter that populations use for many purposes (cooking oil, soap manufacture, cosmetics, etc.)

After extraction of this butter, big quantities of residues remain. Their proximate composition are : proteins (14%), sugars (25%), fats (22.5%), and polyphenols (20.03 %), mainly tannins compounds. Tannins compound are not easily biodegradable and are toxic for cold blood animals. Furthermore, when deposited on ground these residues stop water and air diffusion in soil, provoking threat for microflora and micro-organisms in this area.

In order to eliminate the harmful effects of tannins compounds on the environment, it has been undertaken in our laboratory the study focusing on the biodegradation of these compounds in anaerobiosis. As result it has been obtained a rate of depollution of approximately 90% with a 2% of substrate loading and quantities of biomethane. Specific microbial consortium has been used after they become acclimatised for one year.

Key words: shea-nut residues, biodegradation, micro-organisms.

* Université de Ouagadougou, Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biochimie-Microbiologie, 03 B.P. 7021 Ouagadougou 03 (Burkina Faso)

Introduction

La pollution de l'environnement par les déchets industriels est un problème qui se pose de plus en plus avec beaucoup d'acuité aussi bien dans les pays développés que dans les pays sous développés. Au Burkina Faso, les tourteaux obtenus après extraction du beurre de karité par pressage des amandes sont rejetés dans la nature. Cette pratique provoque des conséquences graves de pollution qui affecte l'écosystème des zones de rejets. C'est le cas de certaines localités de la province du Houet polluées par les rejets de l'usine CITEC-HUILERIE.

Les tourteaux de karité constituent un produit polluant à cause de leur richesse en composés polyphénoliques difficilement biodégradables et en acides gras à longues chaînes.

En effet, les lipides empêchent la diffusion de l'air et de l'eau dans le sol, provoquant ainsi un effet néfaste pour la microflore tellurique et pour les plantes. Ce fait est caractérisé par l'absence de végétation sur les sites de dépôts. Les dérivés polyphénoliques, notamment les tannins sont des substances biologiquement actives. En solution ils sont le siège d'oxydation secondaire (FIELD et LETTINGA, 1989). Ils sont toxiques pour les animaux à sang froid, surtout aquatiques (MAHADEVAN et MUTHUKUMAR, 1980 ; DESCHAMPS, 1985). Ils possèdent aussi des propriétés antimicrobiennes (BASARABA, 1964 ; GOLDSTEIN et SWAIN, 1965 ; BENOIT et STARKEY, 1968 ; FIELD et LETTINGA, 1985 ; FIELD *et al.*, 1989 ; SCALBERT, 1991 ; FIELD et LETTINGA, 1992). Ils ont aussi une structure chimique très stable à cause de leur noyau aromatique (BERRY *et al.*, 1987). Ils peuvent néanmoins être dégradés par certains micro-organismes (WILLIAM et EVANS, 1973 ; BERRY *et al.*, 1987 ; FIELD et LETTINGA, 1992 ; DESCHAMPS, 1985 ; NELSON *et al.*, 1995). La présence de composés tanniques dans les tourteaux de karité va donc influencer leur processus de biodégradation.

Matériels et méthodes

Etude de la composition chimique

Toutes les analyses ont été faites sur la poudre de tourteau de karité tamisée à 0,5 mm près. Chaque dosage a été réalisée quintuple.

Les teneurs en matière sèche, solides volatils et cendres ont été déterminées respectivement par séchage des échantillons à 103 °C, puis par calcination à 450 °C et 550 °C.

Les taux de carbone et d'azote ont été déterminés par les méthodes standards (AOAC, 1984).

La teneur en matière grasse a été déterminée par extraction utilisant un solvant organique selon les principes de AFNOR, NF-V-03-905, 1973.

La teneur en sucres a été déterminée par la méthode de MONTREUIL et SPIK (1969). Les teneurs en sodium et en potassium ont été déterminées par la photométrie de flamme (AUDIGIE *et al.*, 1980). La teneur en phosphore a été déterminée après digestion acide, selon la méthode standard (AOAC, 1984). Les tannins ont été dosées suivant la méthode décrite par DALSAGER en 1984.

Etude des activités des populations microbiennes

Pour les essais de fermentation nous avons utilisé le même dispositif expérimental que celui de TRAORÉ (1995). Il comprend un fermenteur de un litre équipé d'un dispositif de prélèvement d'échantillon et de récupération de gaz. L'inoculum I a été prélevé à la station d'épuration de l'abattoir frigorifique de Ouagadougou. Cet inoculum a été acclimaté pendant une année sur le substrat et noté I'. L'inoculum endogène est désigné par I₀. La température et le temps d'incubation ont été respectivement de 37 °C et de 30 jours.

Le dosage des acides gras volatils (AGV) et du titre alcalimétrique complet (TAC) a été effectué selon la méthode décrite par TRAORÉ (1995). Les gaz produits ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse grâce à un chromatographe à catharomètre Girdel série 30, type 30-c-TP n° 900.

L'ammoniaque a été dosé dans les effluents selon la méthode de KJELDHAL (AUDIGIE *et al.*, 1980). Les sulfures ont été dosés dans les effluents selon la méthode de FOGO *et al.* (1949).

Les rendements d'épuration ont été évalués par les taux d'abaissement de la demande chimique en oxygène (DCO). La demande chimique en oxygène (DCO) a été déterminée selon la norme AFNOR NFT 90 -101, 1988.

Résultats

Les tableaux I et II donnent respectivement quelques paramètres chimiques du tourteau de karité et leur comparaison à ceux de substrats d'origine agricole. Il ressort de ces tableaux les remarques suivantes :

– les tourteaux de karité contiennent des composés chimiques et macromoléculaires biodégradables notamment les protéines (14,22 0,18 %), les glucides (24,56 0,40 %), les lipides (22,55 ± 0,18 %).

– cependant ils renferment aussi de fortes teneurs en tannins (20,03 0,54 %), composés possédant une certaine toxicité dans la nature.

Les figures 1, 2, 3, 4 et 5 présentent l'évolution de quelques paramètres physico-chimiques au cours de la fermentation. On observe les faits suivants :

– dès les premières 24 heures, on enregistre une accumulation progressive des AGV. Elle se produit jusqu'aux environs du 10^e jour : c'est la phase d'acidogénèse de la fermentation, phase à laquelle la teneur des AGV atteint 2500 mg / ml ;

– puis, suit une phase de dégradation des AGV dont la teneur diminue assez rapidement dans le milieu de culture ;

– quant au titre d'alcalimétrie complet (TAC) du milieu, il reste assez stationnaire aux alentours de 800 mg/ml, présentant une valeur minimum à la zone du pic de production des AGV (2500 mg / ml) ;

– le suivi du pH pendant les 30 jours de fermentation montre que ce paramètre varie de 7 (pH initial) à 5,9 (pH final). Ce paramètre varie en sens inverse par rapport aux AGV.

– l'accumulation des tannins dans le milieu de culture s'observe du 1^{er} au 15^e jour. Les teneurs de ces constituants diminuent ensuite dans le milieu de croissance, consécutivement à leur biodégradation par un inoculum qui a été acclimaté pendant 12 mois (figure 6). L'inoculum ainsi acclimaté et stabilisé a permis la production des constituants suivants : ammoniacque NH₄⁺, sulfure d'hydrogène H₂S (tableau III) et méthane (CH₄) (figure 7).

La production du méthane augmente fortement après le 10^e jour, période correspondant à l'utilisation des AGV et des tannins.

Nous avons parallèlement suivi le rendement d'épuration des rejets de ces tourteaux de karité en mesurant la baisse de la DCO de l'effluent. Les résultats sont illustrés par les figures 8 et 9. On observe que plus les concentrations en substrat sont élevées, plus le rendement d'épuration est faible. Il varie ainsi entre 95 % et 70 % pour les charges respectives de 0,5 % et 4 % de substrat.

Tableau I. Quelques paramètres chimiques du tourteau de karité.

% MS	96,89 ± 0,25	% protéines	14,22 ± 0,18
% SV	77,34 ± 1,51	% glucides	24,56 ± 0,40
% cendres	8,77 ± 0,23	% lipides	22,55 ± 0,18
% carbone	53,37 ± 0,85	% phosphore	1,72 ± 0,01
% MO	92,01 ± 1,45	% sodium	0,33 ± 0,02
% N	2,27 ± 0,18	% potassium	1,63 ± 0,02
% soufre	0,48 ± 0,01	% tannins	20,03 ± 0,54

Tableau II. Comparaison de quelques paramètres chimiques du tourteau de karité et de quelques substrats rencontrés au Burkina Faso.

Matériel	Solides volatiles (%)	Cendres (%)	Carbone (C) (%)	Azote (N) (%)	C/N
Tourteau de karité	77,34 ± 1,54	8,77 ± 0,23	53,37 ± 0,85	2,27 ± 0,18	23,46 ± 0,67
<i>Calotropis procera</i> ¹	80,52 ± 0,92	9,74 ± 1,36	43,72 ± 1,72	2,59 ± 0,22	16,88 ± 1,67
Tourteau d'arachide ¹	68,80 ± 0,67	7,64 ± 1,00	44,22 ± 1,30	2,20 ± 0,14	20,10 ± 1,29
Tige de maïs ¹	88,15 ± 0,93	6,72 ± 0,43	50,26 ± 0,98	0,60 ± 0,02	83,07 ± 2,36
Tige de millet ¹	85,39 ± 1,43	9,44 ± 2,08	47,85 ± 0,73	1,49 ± 0,09	32,11 ± 1,80
Tige de riz ¹	72,75 ± 1,5	12,88 ± 1,79	43,35 ± 1,72	0,91 ± 0,07	47,63 ± 1,40
Tige de sorgho ¹	86,42 ± 1,36	9,25 ± 0,50	54,68 ± 0,52	0,96 ± 0,09	55,92 ± 1,71

¹ source : TRAORÉ S. A. (1992)

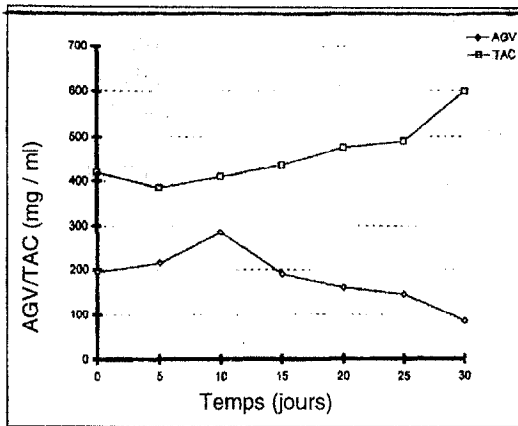


Figure 1. Évolution des AGV et TAC (milieu à 0,5 % de substrat).

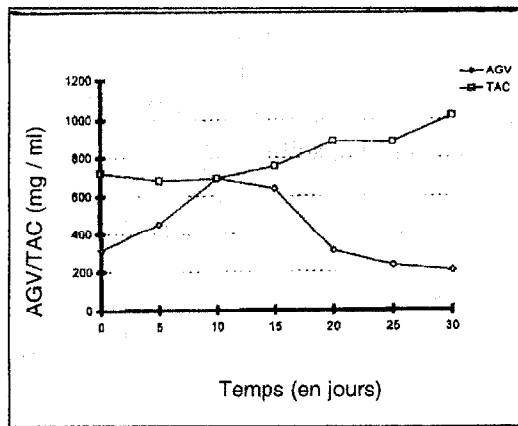


Figure 2. Évolution des AGV et TAC (milieu à 1 % de substrat).

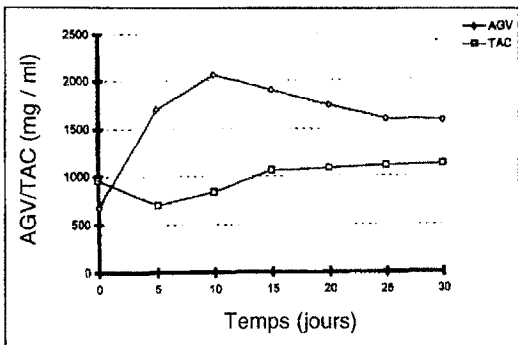


Figure 3. Évolution des AGV et TAC (milieu à 2 % de substrat).

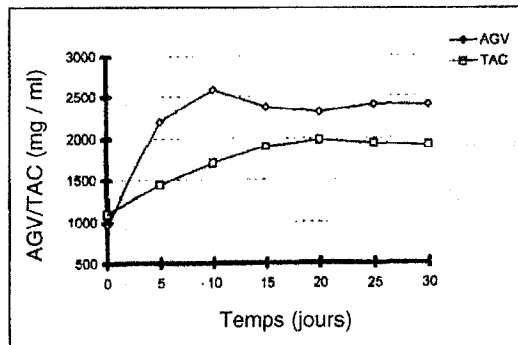


Figure 4. Évolution des AGV et TAC (milieu à 4 % de substrat).

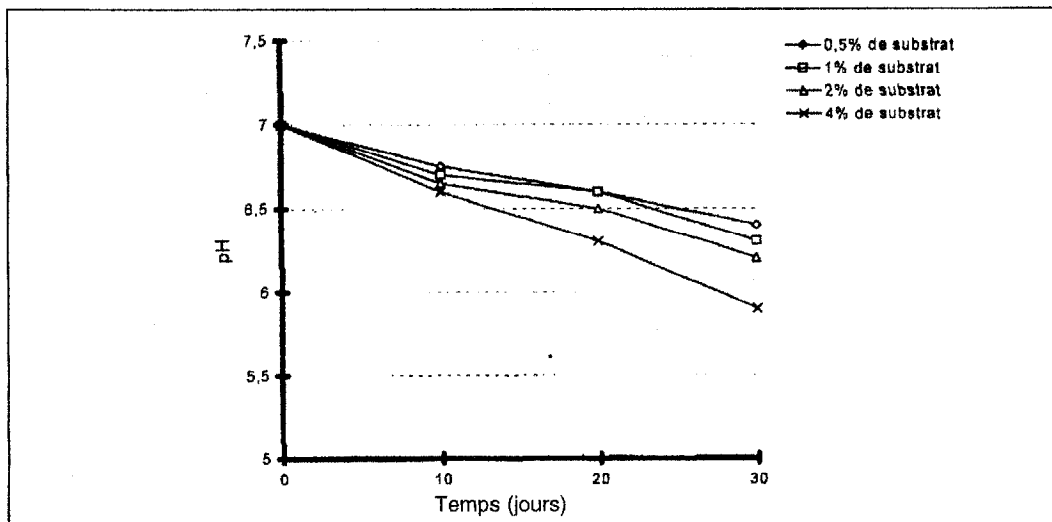


Figure 5. Évolution du pH au cours de 30 jours de fermentation.

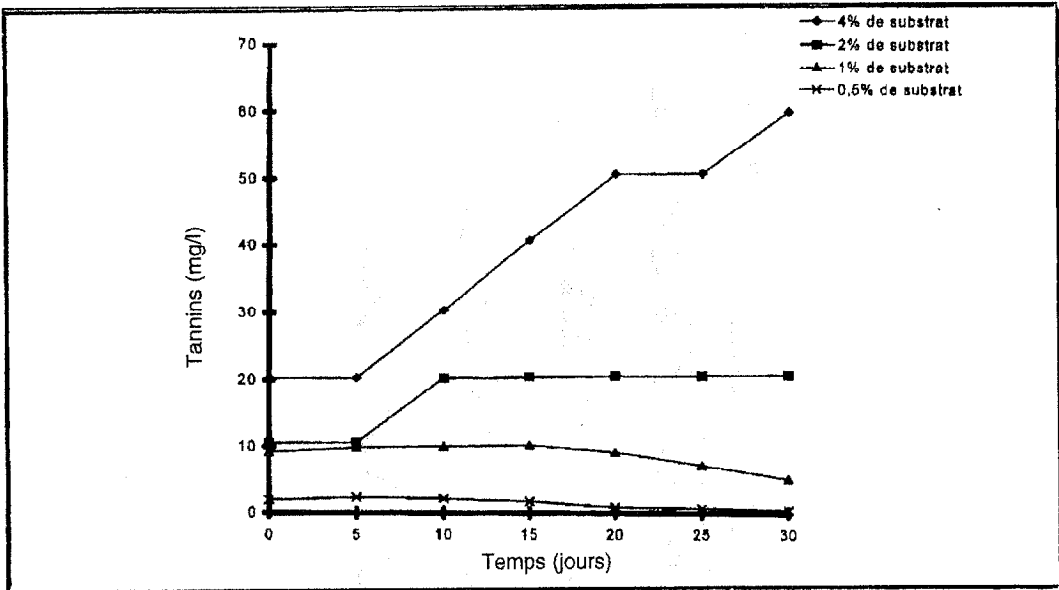


Figure 6. Évolution des AGV et TAC (milieu à 2 % de substrat).

Tableau III. Teneurs en ammoniacque et en sulfures obtenues avec l'inoculum acclimaté au bout de 30 jours de fermentation

Teneur en substrat du milieu de culture	0,5 %	1 %	2 %	4 %
Teneur en NH_4^+ (mg / l)	74.050.21	221.422.44	503.372.54	853.553.01
Teneur en sulfures (mg / l)	21.331.71	29.441.62	70.701.22	99.501.52

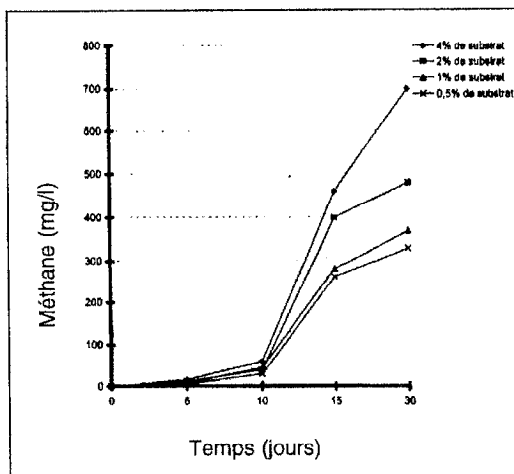


Figure 7. Production de méthane au cours de la fermentation

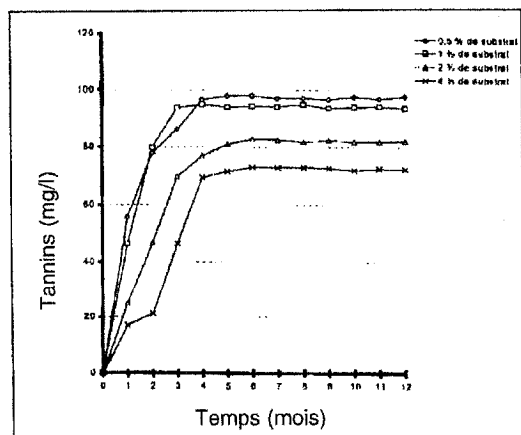


Figure 8. Évolution du taux d'épuration en fonction du taux de substrat et du temps d'acclimatation de l'inoculum.

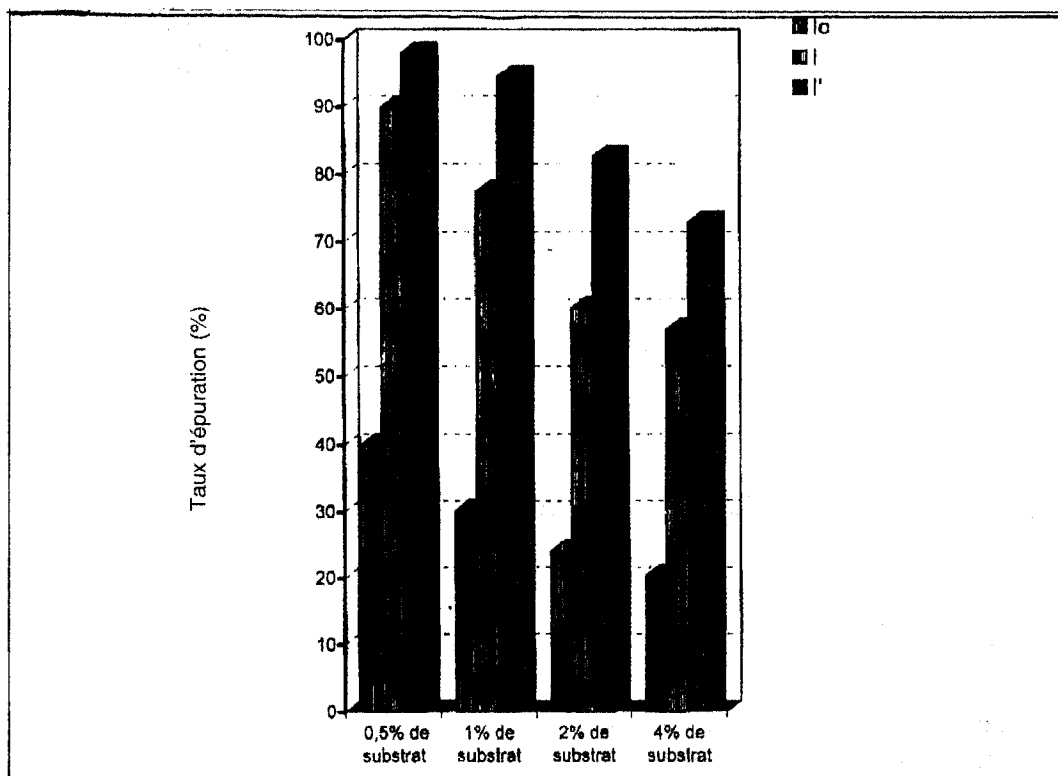


Figure 9. Évolution du taux d'épuration en fonction du taux de substrat et de l'inoculum utilisé.

Discussion et conclusion

Les tourteaux de karité ont une composition et macromoléculaire comparable à celle de plusieurs produits agricoles comme le maïs, le mil, le riz et l'arachide ;

Les rapports C/P (31,03) et C/N (23,46) déduits des teneurs en carbone, en phosphore et en azote sont favorables à la fermentation du substrat par les microorganismes (FINK *et al.*, 1978 ; TRAORE, 1995).

Nous constatons une forte teneur en tannins (20,03 %). Les tannins possèdent des propriétés antimicrobiennes. L'inhibition de l'activité des microorganismes résulte des réactions de précipitation entre les tannins et les enzymes cataboliques surtout (GOLDSTEIN et SWAIN, 1965 ; DESCHAMPS, 1985 ; BORNEMAN *et al.*, 1986 ; FIELD et LETTINGA, 1992). Elle se situe aussi au niveau de la respiration (BASARABA, 1965) et de la nitrification (BASARABA, 1964). Le pouvoir inhibiteur des tannins s'accroît avec les différentes opérations de traitement (stockage, broyage, cuisson) des amandes de karité. Ces opérations favorisent les réactions d'oxydation des molécules de tannins. Ces réactions conduisent à la formation de polymères de poids moléculaires élevés (MATHEW et PARPIA, 1971 ; HASLAM et LILLEY, 1988 ; MARTIN et AKIN, 1988 ; FIELD et LETTINGA, 1989 ; CHEFTEL *et al.*, 1990). Les oligomères formés ont une toxicité plus

élevée pour les micro-organismes que leurs monomères (FIELD et LETTINGA, 1992). De plus, les tannins réagissent avec la plupart des constituants du tourteau de karité (protéines, glucides, ions). Il en résulte une inhibition indirecte de l'activité métabolique des bactéries (FIELD, 1985).

Les faibles teneurs en sodium, potassium et soufre constituent un avantage pour la digestion anaérobie des tourteaux de karité. En effet, les ions sodium et potassium stimulent la digestion anaérobie à des concentrations élevées (COUPLÉ et ALBAGNAC, 1978). Quant au soufre, sa faible teneur est favorable à la digestion anaérobie car les teneurs élevées peuvent stimuler l'activité des bactéries sulfato-réductrices. L'importante production de sulfures qui va en résulter peut inhiber la digestion anaérobie du substrat puisque les sulfures sont toxiques pour les micro-organismes de la digestion anaérobie au dessus de 200 mg / litre (COUPLÉ et ALBAGNAC, 1978).

Les AGV produits résultent du métabolisme des bactéries acidogènes, tandis que les carbonates et bicarbonates (TAC) qui se forment proviennent de la dissolution du gaz carbonique produit par l'activité de ces bactéries dans la phase aqueuse des milieux (EDELIN, 1972 ; HOBSON *et al.*, 1974 ; FINK et GOMA, 1978). L'accumulation des AGV dans les digesteurs est responsable de la baisse du pH entraînant une inhibition des bactéries non acidophiles. De plus, lorsque le pH décroît dans les milieux, les proportions des acides organiques tels que le lactate, le succinate, le propionate et le butyrate augmentent; leur accumulation dans les digesteurs inhibe le métabolisme des bactéries anaérobies (EDELIN, 1972 ; COLIN et MUNK-KOEFOED, 1988). L'inhibition de l'activité microbienne par la baisse du pH peut aussi s'expliquer par la destruction du gradient de pH qui existe entre les deux faces de la membrane plasmique des bactéries (HOBSON *et al.*, 1974). Ce dernier est lié à la formation d'énergie sous forme d'ATP indispensable au métabolisme des substrats (BELAICH, 1963 ; DODDENA *et al.*, 1978 ; MONTFORT, 1978).

La solubilisation des tannins dans la phase aqueuse est liée à la production d'acides organiques et d'alcools d'une part (les tannins sont plus solubles dans ces substances) et à la digestion des autres constituants fermentescibles auxquels étaient liées les molécules de tannins dont la biodégradation est plus lente et plus difficile d'autre part (BERRY *et al.*, 1987; FIELD et LETTINGA, 1992).

La diminution de la teneur en tannins constatée dans les milieux à 0,5 et 1 % de substrat au bout d'un certain temps est due à leur teneur relativement faible dans les milieux (FIELD et LETTINGA, 1992 ; NELSON *et al.*, 1995). Les résultats montrent effectivement qu'il y a une biodégradation des tannins seulement dans les milieux à 0,5 et 1 % de substrat.

L'inhibition du métabolisme bactérien par les tannins s'effectue de deux façons: l'inhibition directe due à l'établissement de liaisons chimiques entre les molécules de tannins et les protéines bactériennes, et l'inhibition indirecte due à l'établissement de liaisons chimiques entre les molécules de tannins et les substrats (glucides, protéines et ions) (BASARABA, 1966 ; BENOIT et STARKEY, 1968).

L'ammoniaque et les sulfures sont respectivement les produits de l'activité des bactéries protéolytiques (WENG et JERIS, 1976 ; COUPLÉ et ALBAGNAC, 1978) et de l'activité des bactéries sulfo et sulfato-réductrices (WIDDEL, 1988). Les concentrations de ces

deux produits dans nos effluents n'atteignent pas les seuils de toxicité pour les micro-organismes ; ces seuils sont de 3000 mg / l pour l'ammoniaque, et 200 mg / l pour les sulfures (COUPLET et ALBAGNAC, 1978).

La production du méthane varie avec le taux de substrat et avec le type d'inoculum utilisé. Les résultats montrent que les meilleurs résultats sont obtenus avec les milieux à 4 % de substrat ; tandis que les milieux à 0,5 et 1 % de substrat donnent des résultats relativement faibles. Plusieurs travaux ont en effet montré l'aptitude des bactéries méthanogènes à produire du méthane en présence ou à partir des tannins (HEALY et YOUNG, 1979 ; FIELD et LETTINGA, 1992). De plus, l'acclimatation de l'inoculum au substrat nous a permis d'accroître ses performances.

Nous constatons au bout de 6 mois d'acclimatation, une augmentation du taux d'épuration de : 55,86, 54,78, 48,18 et 42,54 % respectivement pour les milieux à 4, 2, 1 et 0,5 % de substrat. L'acclimatation augmente donc l'efficacité de l'inoculum à digérer ce substrat. En effet elle permet aux micro-organismes de développer des caractères génétiques adaptés aux tannins. Le rôle de nombreux plasmides a en effet été identifié dans la dégradation de molécules chimiques mono ou polynucléaires (CHAKRABARTY, 1982; BERRY *et al.*, 1987). De plus, il a été montré que l'acclimatation d'une culture bactérienne à un composé chimique, peut l'adapter à la dégradation de molécules de structure chimique voisine (HEALY et YOUNG, 1979 ; COLIN et MUNK-KOEFOD, 1988). Ces deux résultats montrent, d'une part, que les taux d'épuration les plus élevés sont obtenus avec l'inoculum acclimaté, et d'autre part, que ces taux augmentent au fur et à mesure que du substrat diminue. Ce dernier résultat s'explique par le fait que l'augmentation du taux de substrat s'accompagne d'une production de plus en plus importante d'acides organiques, de tannins, d'ammoniaque et de sulfures.

Au regard de ces résultats, nous pouvons dire que sur le plan de la dépollution, l'utilisation de faibles taux de charge nous a donné des résultats satisfaisants. En effet, les milieux à 0,5 et 1 % de substrat donnent plus de 80 % d'épuration ; de plus les quantités des produits pouvant s'avérer polluant pour l'environnement (acides organiques, ammoniaque, sulfures et tannins) sont faibles dans les effluents. Au plan énergétique, les milieux à 2 et 4 % de substrat donnent les meilleurs résultats ; car des quantités de méthane produit sont relativement élevées. □

Références bibliographiques

- AFNOR, 1973. Graines oléagineuses. Détermination de l'extrait à l'hexane. NF-V-03-905.
- AOAC, 1984. Official Methods of Analysis, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- AUDIGIE C., FIGARELLA, J. et ZONZAIN F., 1980. Manipulation d'analyse biochimique. Doins (éd). Paris, 274 p.
- BASARABA J., 1964. Influence of vegetable tannins on nitrification in soil. *Plant Soil*, 21: 8-16.
- BASARABA J., 1966. Effects of vegetable tannins on glucose oxidation by various microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 12: 787-794.
- BELAICH J. P., 1963. Thermogénèse et croissance de *P. lindneri* en glucose limitant. *C. R. Soc. Biol.*, 157: 316-322.
- BENOIT R. E. et STARKEY., 1968. Enzyme inactivation as a factor in the inhibition of decomposition of organic matter by tannins. *Soil Sci.* 105: 203-208.

- BERRY D. F., FRANCIS A. J., and BOLLAG J. M., 1987.** Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiol. rev.*, 51: 43-59.
- BORNEMAN W. S., AKIN, D. E. et ESELTINE W. P., 1986.** Effect of phenolic monomers on ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1331-1339.
- CHAKRABARTY A. M., 1982.** Biodegradation and detoxification of environmental pollutants. CRS Press, 127-139.
- CHEFTEL J. C., CHEFTEL H., et BESANCON P., 1990.** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Vol. 1, 6^e éd., 381 p.
- COLIN F. et MUNK-KOEFOED N., 1988.** Evaluation de la biodégradabilité dans le traitement anaérobie des effluents et boues industriels. In *Anaerobic Digestion 1988. Proc. 5th Int. Symp.*, E. R. HALL and P. N. HOBSON (eds), Pergamon press, New-York, 471-178.
- COUPLLET P. et ALBAGNAC G., 1978.** La digestion anaérobie, application aux industries agro-alimentaires. *Ann. Technol. Agric.* 27 (2): 533-564.
- DALSAGER P., 1984.** Méthode de référence pour le dosage des tannins. *Communautés européennes, J. O.*, n° L197/18, 72-74.
- DESCHAMPS A. M., 1985.** Evaluation de la dégradation de deux types de tanin condensé par les bactéries isolées d'écorces en décomposition. *Can. J. Microbiol.* 31: 499-502.
- DESCHAMPS A. M., OTUK G. et LEBEAULT J. M., 1983.** Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. *J. Ferment. Technol.* 61: 55-59.
- DODDENA H. J., HUTTEN T. J., VAN DER DRIFT C. and VOGELS G. D., 1978.** ATP hydrolysis and synthesis by the membrane-bound ATP synthetase complex of *M. thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.*, 136: 19-23.
- EDELIN F., 1972.** Les eaux résiduaires de sucreries et de distilleries de mélasse. 12^e Symposium International, Budapest, Mars 1970, éd. Dr JUNK, N. V., La Haye, 375-385.
- FIELD J. A., 1985.** The role of phenolic and humic compounds in anaerobic digestion processes. *Biotreatment Systems.* 2: 95-123.
- FIELD J. A. et LETTINGA G., 1989.** The effect of oxidative coloration on the methanogenic toxicity and anaerobic biodegradability of phenols. *Biological Wastes.* 29: 161-179.
- FIELD J. A. et LETTINGA G., 1992.** Biodegradation of tannins. *Metal Ions Biol. Syst.* 48: 61-97.
- FINK J. D. et GOMA G., 1978.** Les principes fondamentaux des mécanismes de la fermentation méthanique. *Biomasse actualité*, 2: 5-11.
- FOGO J. K. and POPOWSKY M., 1949.** Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide. *Anal. Chem.*, 21: 732-734.
- GOLSTEIN J. L. et SWAIN T., 1965.** The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry*, 4: 1985-192.
- HASLAM E. et LILLEY T. H., 1988.** Natural astringency in foodstuffs-a molecular approach. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 27: 1-38.
- HEALY J. B. and YOUNG L. Y., 1979.** Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 84-89.
- HOBSON P. N., BOUSFIELD S., et SUMMER R., 1974.** Anaerobic digestion of organic matter. *Crit. Rev. Environ. Control*, 4: 131-191.
- MAHADEVAN A. et MUTHUKUMAR G., 1980.** Aquatic microbiology with reference to tannin degradation. *Hydrobiology*, 72: 73-79.
- MARTIN S. A. and AKIN D. E., 1988.** Effect of phenolic monomers on the growth and -glucosidase activity of *Bacteroides ruminicola* and on the carboxymethylcellulase, -glucosidase, and xylase activities of *Bacteroides succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 3019-3022.
- MATHEW A. G. and PARIPIA H. A. B., 1971.** Food browning as a polyphenol reaction. *Adv. Food. Rev.*, 19-75.
- MONTFORT D. O., 1978.** Evidence for ATP synthesis driven by a proton gradient in *M. barkeri*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 85: 1346-1351.
- MONTREUIL J. et SPIK G., 1969.** Microdosage des glucides: méthode colorimétrique de dosage des glucides totaux. Monographie du Labo-Chimie-biol., Fac. Sc. Lille.
- NELSON K. E., PELL A. N., SCHOFIELD P. and ZINDER S., 1995.** Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolysable tannins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (9): 3293-3298.

SCALBERT A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.

SCHAEFER D. M., DAVIS C. L. et BRYANT M. P., 1980. Ammonia constants for predominant species of rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 63: 1248-1263.

TRAORE S. A., 1992. Biogas production from *Calotropis procera*: A latex plant found in West Africa. *Bioresource Technology* 41: 105-109.

WENG C. N. and JERIS J. S., 1976. Biochemical metabolisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. *Water Res.*, 10: 9-18.

WIDDEL F., 1988. Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria. In *Biology of Anaerobic Microorganisms*. ZEHNDER A. J. B., (ed), John W. & Sons, New-York, 469-585.

WILLIAMS R. J. and EVANS W. C., 1973. Anaerobic metabolism of aromatic substrates by certain microorganisms. *Biochem. Soc. Trans.*, 1: 186-187.