



UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

-----  
UNITE DE FORMATION ET DE  
RECHERCHE-SCIENCES DE LA VIE  
ET DE LA TERRE (UFR-SVT)

-----  
Centre de Recherche en Sciences  
Biologiques Alimentaires et  
Nutritionnelles (CRSBAN)



CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET  
TECHNOLOGIQUE

-----  
INSTITUT DE RECHERCHE EN  
SCIENCES APPLIQUEES ET  
TECHNOLOGIES (IRSAT)

-----  
Département Technologie Alimentaire  
(DTA)



UNIVERSITY OF  
COPENHAGEN

-----  
FACULTY OF LIFE SCIENCE

-----  
Department of Food Science  
Food Microbiology

## THESE DE DOCTORAT D'ETAT

Présentée pour l'obtention du titre de  
**DOCTEUR Es-SCIENCES**

Spécialité : Sciences Biologiques Appliquées  
Option : Biochimie - Microbiologie (Microbiologie et Technologie Alimentaire)

Par

**Hagrétou SAWADOGO-LINGANI**  
Docteur de 3<sup>ème</sup> Cycle Biochimie-Microbiologie

**LA FERMENTATION LACTIQUE DANS LE PROCÉDE TRADITIONNEL DE  
FABRICATION DE LA BIÈRE DE SORGHO (*dolo, pito*) : CARACTERISATION  
DES BACTERIES LACTIQUES POUR LA SELECTION DE CULTURES STARTER**

Soutenue le 2 Mars 2010 devant la commission d'examen :

**Président** : Pr. Joseph HOUNHOUGAN, Professeur titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

**Membres** : Pr. Alfred S. TRAORE, Professeur titulaire, Université de Ouagadougou, Burkina Faso  
Pr. Aboubacar S. OUATTARA, Maître de Conférences, Université de Ouagadougou (Rapporteur)  
Pr. Bréhima DIAWARA, Maître de Recherche, CNRST, Burkina Faso  
Dr. Wisdom K. AMOA-AWUA, Senior Researcher, CSIR/FRI, Ghana

DEDICACE

*À la mémoire de mon père et à celle de ma  
mère !*

*À mes enfants Ismaël, Yasmina, Fayçal et Rachid  
et mon époux, qui ont su faire preuve de tolérance et de  
patience tout au long de ce travail !*

*À mes parents !*

*À tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce  
travail !*

## REMERCIEMENTS

Les travaux qui font l'objet du présent mémoire de thèse de Doctorat d'Etat ont bénéficié du financement du Projet DANIDA «Capability Building for Research and Quality Assurance in Traditional Food Processing in West Africa / STS4, J. nr. 104 dan. 8L. / 1101 » Ils ont été réalisés au Laboratoire du Département Technologie Alimentaire (DTA) de l'IRSAT/CNRST, Ouagadougou (Burkina Faso) et au Laboratoire de Biologie Moléculaire du Department of Food Science, Food Microbiology (University of Copenhagen, Denmark), avec la collaboration du Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles de l' UFR-SVT (Département de Biochimie – Microbiologie, Université de Ouagadougou) et le Department of Applied Biology (Faculty of Applied Sciences, University for Development Studies, Tamale, Ghana).

J'exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance aux différents responsables de ce projet et structures impliquées, sans lequel ce travail ne serait réalisé. Aussi, ce travail n'aurait pu être mené à bout sans le soutien de nombreuses personnes auxquels je tiens à exprimer toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance.

Je remercie sincèrement :

- Pr Alfred S. TRAORE du Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN) de l'Université de Ouagadougou, qui a bien voulu accepter mon inscription en Thèse d'Etat sous sa direction et pour m'avoir initiée aux travaux de recherche, encadrée et soutenue tout au long de mon cursus universitaire.
- Pr Mogens JAKOBSEN, du Department of Food Science, Food Microbiology, de l'Université de Copenhagen, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, encadrée, soutenue et assistée tout au long de ces travaux.
- Dr Bréhima DIAWARA, Maître de Recherche au DTA/IRSAT/CNRST, pour son encadrement, son soutien, ses encouragements et ses conseils.
- Pr Joseph HOUNHOUIGAN de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin), Pr Aboubacar S. OUATTARA de l'Université de Ouagadougou, Dr Wisdom K. AMOA-AWUA du Food Research Institute (Ghana), pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail en acceptant de le juger; leur participation au jury me fait un grand honneur.
- Dr Dayéri DIANOU, Maître de Recherche à l'IRSS/CNRST pour sa disponibilité, son soutien constant, ses critiques constructifs et ses suggestions et pour avoir bien voulu accepté de relire le manuscrit.
- Dr Léguet GANOU, Chargé de recherche au DTA/IRSAT/CNRST pour son soutien, ses suggestions et ses encouragements.
- Dr Alhadi WEREME, Maître de Recherche et Directeur de l'IRSAT/CNRST pour ses encouragements et ses conseils.
- Pr Nicolas BARRO de l'Université de Ouagadougou pour son assistance technique, son soutien et ses encouragements.

- Dr Vicky LEI, Dr Dennis S. NIELSEN et Mr. Per PETERSON chercheurs et technicien au Department of Food Science, Food Microbiology (University of Copenhagen) pour leur assistance scientifique et technique lors de nos séjours à Copenhagen.

- Dr Irène L. OUOBA Enseignant - chercheur à Microbiology Research Unit, London Metropolitan University (United Kingdom) pour son soutien et son assistance.

- Dr Richard GLOVER Enseignant-chercheur à Faculty of Applied Sciences, University for Development Studies (Tamale, Ghana) pour son assistance pendant nos séjours à Tamale.

- Mesdames Maïmounata CONGO, Sidonie OUEDRAOGO, Clarisse COMPAORE, Marie Solange SOMDA et Rosalia MEDA, Messieurs Michel COMBARI, Donatien KABORE, Charles PARKOUDA, Boniface BOUGOUMA et le personnel du DTA/IRSAT/CNRST pour leur assistance technique, leur soutien et leurs encouragements.

- Pr Mamadou DICKO, Dr Philippe NIKIEMA, Dr Cheick OUATTARA, Dr Marcel BENGALI, Dr Aly SAVADOGO et tous les collègues du Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles pour leur collaboration et leur soutien.

- Tous les stagiaires et tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail.

J'exprime toute ma profonde reconnaissance aux productrices de *dolo* et de *pito* qui ont été associées à ce travail, pour leur disponibilité et leur franche collaboration.

## RESUME / ABSTRACT

Le *dolo* et le *pito* sont deux bières traditionnelles (boissons fermentées), produits à partir des grains de sorgho. Le procédé de fabrication qui comprend le maltage des grains de sorgho et le brassage, a été étudié à Ouagadougou (Burkina Faso) et à Tamale (Nord Ghana). Des prélèvements ont été effectués au cours du maltage et du brassage, sur la matière première, les produits intermédiaires et les produits finis, pour les analyses microbiologiques et physico-chimiques et l'isolement de bactéries lactiques. L'approche polyphasique a été utilisée pour l'identification des isolats notamment les caractéristiques biochimiques, le profil de fermentation des hydrates de carbones (API 50 CHL), le profil ITS-PCR/RFLP, le profil PFGE et la séquence partielle de l'ADN. Des propriétés technologiques des isolats ont été déterminées principalement l'activité acidifiante, la production de polysaccharides exocellulaires (EPSs), l'activité amylasique et l'activité antimicrobienne. Quatre souches de bactérie lactique sélectionnées sur la base de leurs propriétés technologiques et un isolat de levure ont été expérimentés comme cultures starter dans la production du *dolo*; les échantillons de *dolo* obtenus ont été soumis à l'appréciation d'un jury de dégustateurs.

Le maltage traditionnel du sorgho comprend les opérations de trempage des grains, de germination et de séchage solaire des grains germés. Une fermentation lactique naturelle non contrôlée a été mise en évidence pendant le trempage des grains avec un développement de bactéries lactiques de  $10^5$  à  $10^9$ - $10^{10}$  ufc/ml (5 à 9-10 log ufc/ml) et une baisse du pH de l'eau de trempage. Les espèces prédominantes associées aux étapes du maltage du sorgho ont été *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici*, *Weissella confusa*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Pendant le trempage, simultanément au développement de *Lact. fermentum*, *Ped. acidilactici* et *W. confusa*, la croissance des bactéries Gram-négatif a été inhibée. 39,62%, 22,64% et 17,92% des isolats dominés par *Lact. fermentum*, ont montré la capacité d'inhiber la croissance respective de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Listeria innocua*. 37,73% des isolats ont montré une faible activité amylasique et 90,5 % ont montré une capacité à produire des EPSs. *Lact. fermentum* a été l'espèce dominante dans les grains de sorgho pendant le trempage et la germination et dans le malt de sorgho.

Le brassage traditionnel du *dolo* et du *pito* comprend principalement le broyage du malt de sorgho, l'empâtage, l'acidification du moût, la cuisson, le refroidissement et la fermentation alcoolique du moût final par l'addition de levure locale. Les bactéries lactiques ont été de l'ordre de 5,6-7,5 log ufc/g dans la farine de malt de sorgho et pendant l'empâtage. Des niveaux similaires de levures et de bactéries Gram-négatif ont été observés. Ces charges microbiennes ont diminué à 3,7-4,5 log ufc/g pour les bactéries lactiques et  $\leq 2$ -3 log ufc/g pour les bactéries Gram-négatif en fin d'empâtage, après un traitement thermique modéré. L'acidification a duré 12-16h selon les sites, et a été caractérisée par une baisse du pH, une augmentation de l'acidité titrable et un développement de bactéries lactiques qui ont atteint 8,8-9,9 log ufc/g, avec par contre une inhibition de la croissance des bactéries Gram-négatif. *Lact. fermentum*, *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lact. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Pediococcus acidilactici* ont été les espèces impliquées dans l'acidification du moût. En plus de ces espèces, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* et *Leuconostoc lactis* ont été également identifiés aux autres étapes du brassage. Le profil des espèces bactériennes a été similaire pour les quatre sites étudiés; cependant, une grande diversité a été observée au niveau des isolats d'une même espèce à travers les profils PFGE. *Lact. fermentum* a dominé la microflore tout au long du brassage, du malt de sorgho au produit fini, notamment pendant la phase d'acidification qui est une fermentation lactique naturelle non contrôlée. Cette

espèce se présente comme un candidat potentiel pour la sélection de cultures starter basée sur les propriétés technologiques des isolats, pour la conduite d'une fermentation lactique contrôlée du moût.

L'étude des propriétés technologiques des isolats de l'espèce dominante, *Lact. fermentum* a montré que 33,3 %, 31,8%, 22,7% et 15,9% des isolats ont la capacité d'inhiber respectivement la croissance de *Staphylococcus aureus* entérotoxine A, *Staph. aureus* entérotoxines A et B, *Escherichia coli* et *Listeria innocua*. En fonction de leur activité acidifiante, les isolats se sont répartis en quatre groupes: G1(43,48% des isolats) avec un taux d'acidification de  $1,14 \pm 0,15 \Delta\text{pH}$  en 6h de fermentation, G2 (36,08% des isolats) avec un taux d'acidification de  $1,12 \pm 0,15 \Delta\text{pH}$  en 9h, G3 (15,65% des isolats) avec un taux d'acidification de  $1,03 \pm 0,07 \Delta\text{pH}$  en 12h de fermentation et G4 (4,78% des isolats) avec  $1,03 \pm 0,07 \Delta\text{pH}$  de taux d'acidification en 15h de fermentation. 88,7% des isolats ont montré une capacité à produire des EPSs, et 15% ont révélé une faible activité amylasique. Les isolats ayant une activité antimicrobienne appartiennent aux groupes G1 (5,76%), G2 (40,38%) et G3 (36,53%). *Lact. fermentum* fermente le moût du *dolo* et du *pito*, en l'acidifiant, en produisant des acides organiques, des EPSs et des substances antimicrobiennes. Des isolats acidifiant rapidement (G1 et G2), possédant une activité antimicrobienne et produisant des EPSs, présentent des potentialités pour être utilisés comme cultures starter dans une fermentation contrôlée du moût. Ceci contribuera à réduire la durée de l'acidification et améliorer la qualité des produits.

Quatre souches de *Lact. fermentum* possédant une activité antimicrobienne et appartenant aux groupes G1 et G2, associées à un isolat de levure (L4) ont été utilisés comme cultures starter dans la production du *dolo* au laboratoire et en unité de production. Les essais ont été réalisés selon le brassage traditionnel (double fermentation lactique puis alcoolique du moût) et par co-fermentation lactique et alcoolique du moût. Une bonne croissance microbienne et une baisse du pH ont été enregistrées pendant la fermentation lactique, la fermentation alcoolique et la co-fermentation lactique et alcoolique lors des essais réalisés au laboratoire. Les essais réalisés en unité de production ont donné des résultats comparables à ceux du laboratoire. Les cultures starter de *Lact. fermentum* ont permis de réaliser la fermentation lactique du moût en 9h à l'unité de production au lieu de 12-16h, durées de la fermentation lactique naturelle non contrôlée dans le procédé traditionnel. Utilisées en culture mixte, *Lact. fermentum* et la levure L4 ont permis de produire du *dolo* en 12 h de co-fermentation au lieu de 21-48 h, durées des fermentations lactique et alcoolique dans le procédé traditionnel. L'utilisation des cultures starter contribue à réduire la durée de production. Les échantillons de *dolo* obtenus avec les cultures starter ont présenté des caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques comparables à celles du *dolo* traditionnel et ont été jugés acceptables par les dégustateurs. L'utilisation de cultures starter de *Lact. fermentum* pour une fermentation contrôlée par inoculation du moût du *dolo* peut être expérimentée à l'échelle pilote.

**Mots clés :** Sorgho, maltage, malt de sorgho, brassage, bière traditionnelle, *dolo*, *pito*, moût, bactéries lactiques, biodiversité, *Lact. fermentum*, propriétés technologiques, cultures starter, fermentation contrôlée.

# THE LACTIC FERMENTATION IN THE TRADITIONAL PROCESSING OF SORGHUM BEER (*dolo*, *pito*): CHARACTERISATION OF LACTIC ACID BACTERIA FOR THE SELECTION OF STARTER CULTURES

## Abstract:

*Dolo* and *pito* are two traditional beers (fermented beverages) produced from sorghum grains. The processing that comprises the malting of sorghum grains and the brewing was studied at Ouagadougou (Burkina Faso) and Tamale (Northern Ghana). Sampling was carried out throughout the malting and the brewing processes and from the raw material to the final products for microbiological and chemical analyses and isolation of lactic acid bacteria (LAB). The polyphasic approach was used for the identification of isolates based on biochemical characteristics such as the carbohydrates fermentation profile (API 50 CHL), ITS-PCR/RFLP and PFGE profiles and the partial sequencing of DNA. Technological properties of the isolates were determined mainly from their acidifying activity, their ability to produce exopolysaccharides (EPSs) and amylase and their antimicrobial activity. LAB strains were selected based on their technological properties and used with an isolate of yeast as starter cultures for the production of *dolo*; then, samples of the *dolo* obtained were tested by a jury for a sensory evaluation.

The traditional malting of sorghum grains involves steeping of grains, germination of the grains and sun drying of germinated grains. Natural lactic acid fermentation occurred during the steeping of grains during which LAB density increased from  $10^5$  to  $10^9$ - $10^{10}$  ufc/ml in the steeping water and the pH of water decreased. The dominant species associated to the different steps of the malting of sorghum were *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici*, *Weissella confusa*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. During the steeping step, the growth of *Lact. fermentum*, *Ped. acidilactici* and *W. confusa* resulted in the inhibition of the growth of Gram-negative bacteria. 39.62%, 22.64% and 17.92% of the isolates dominated by *Lact. fermentum* showed the ability to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua*, respectively. 37.73% of the isolates showed a light amylolytic activity, and 90.5% revealed the ability to produce EPSs. *Lact. fermentum* dominated the microbiota in the sorghum grains, during steeping, germination and in the sorghum malt.

The traditional brewing of *dolo* and *pito* involves the milling of sorghum malt, mashing, acidification, cooking, cooling and the alcoholic fermentation of the final wort by the addition of local yeast. LAB counts were 5.6-7.5 log ufc/g in the flour of sorghum malt and during the mashing step. Similar densities of yeast and Gram-negative bacteria were found in the same samples; these levels decreased to 3.7-4.5 log ufc/g for LAB and  $\leq 2$ -3 log ufc/g for Gram-negative bacteria, at the end of mashing after a mild heat treatment. During the acidification lasting for 12-16h, the LAB counts increased to 8.8-9.9 log ufc/g, pH decreased and titratable acidity increased while the growth of Gram-negative bacteria was inhibited. *Lact. fermentum*, *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lact. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Pediococcus acidilactici* were the dominant species involved in the acidification process. In addition to these species, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Leuconostoc lactis* were also identified at the different steps of brewing. The profiles of the dominant species were similar at the four production sites investigated; however, a high diversity was observed at strain level within the same species from the PFGE profile. *Lact. fermentum* dominated the microbiota during brewing from the sorghum malt to the final products, mainly during the acidification of the wort, which is a natural lactic acid fermentation. Thus, this species appears as a potential starter culture candidate for a controlled fermentation of the wort.

The investigations on the technological properties of the isolates of the dominant species i.e. *Lact. fermentum*, showed that 33.3 %, 31.8%, 22.7% and 15.9% of the isolates had the ability to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A, *Staph. aureus* enterotoxins A and B, *Escherichia coli* and *Listeria innocua*, respectively. Based on their acidifying activity, the isolates clustered in four groups: G1 (43.48% of the isolates) with an acidification rate of  $1.14 \pm 0.15$  ΔpH after 6h of fermentation, G2 (36.08% of the isolates) with an acidification rate of  $1.12 \pm 0.15$  ΔpH after 9h, G3 (15.65% of the isolates) with an acidification rate of  $1.03 \pm 0.07$  ΔpH after 12h of fermentation and G4 (4.78% of the isolates) with  $1.03 \pm 0.07$  ΔpH as an acidification rate after 15h of fermentation. 88.7% of the isolates had the ability of producing EPSs and 15% showed a light amylolytic activity. The isolates which revealed an antimicrobial activity belonged to groups G1 (5.76% of the isolates), G2 (40.38%) and G3 (36.53%). *Lact. fermentum* ferments the wort of *dolo* and *pito* by acidifying it and producing organic acids, EPSs and antimicrobial compounds. Rapid acidifying isolates (G1 and G2) with antimicrobial activity and producing EPSs have the potential to be used as starter cultures for a controlled fermentation of the wort. This will contribute to reduce the duration of the acidification step and to improve the quality of the products.

Four strains of *Lact. fermentum* having an antimicrobial activity and belonging to groups G1 and G2, associated with an isolate of yeast (L4), were used as starter cultures in the production of *dolo* in the laboratory and a production site. The trials were done according to the traditional brewing process (lactic fermentation and then alcoholic fermentation of the wort) and by a lactic and alcoholic co-fermentation. A rapid decrease in pH and a good growth of microorganisms (LAB and yeast) were observed during the controlled lactic and alcoholic fermentations and during the lactic - alcoholic co-fermentation carried out in the laboratory. The results obtained at the production site were similar to those of the laboratory. When *Lact. fermentum* was used as starter cultures it reduced the acidic fermentation of the wort at the production site from 12-16h to 9h. When *Lact. fermentum* and yeast L4 were used as mix culture, *dolo* was produced after 12h of co-fermentation instead of 21-48h, for the combined duration of both lactic and alcoholic fermentations of the traditional brewing. The use of starter cultures therefore reduced the duration of the entire process. The sensorial quality and physicochemical characteristics of the *dolo* samples obtained were comparable to those of the traditional *dolo*. The utilisation of *Lact. fermentum* starter cultures for a controlled fermentation of *dolo* wort can be experimented at pilot plant level.

**Keywords:** Sorghum, malting, sorghum malt, brewing, traditional beer, *dolo*, *pito*, wort, lactic acid bacteria, biodiversity, *Lact. fermentum*, technological properties, starter cultures, controlled fermentation.



## Liste des Figures

Figure 1: Structure du grain de sorgho d'après Sautier et O'Deye (1989).....	15
Figure 2 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques.....	23
Figure 3: Classification simplifiée des bactéries lactiques associées aux produits alimentaires...	24
Figure 4: Arbre phylogénétique des bactéries lactiques sur la base de l'analyse de séquence de l'ADN.....	25
Figure 5: Différenciation entre les <i>Lactobacillus</i> d'après Botazzy (1983) modifiée par Songisepp (2005).....	28
Figure 6 : Diagramme général du procédé traditionnel de production du malt de sorgho à Ouagadougou (Burkina Faso) et à Tamale (Ghana).....	53
Figure 7: Gels d'agarose des produits ITS-PCR/RFLP d'espèces dominantes de bactéries lactiques isolées du maltage traditionnel du sorgho à Tamale (Ghana).....	56
Figure 8 : Diagramme général du procédé traditionnel de production du moût du <i>dolo</i> et du <i>pito</i> dans les quatre sites à Ouagadougou et Tamale.....	74
Figure 9 : Evolution des bactéries lactiques durant la production du moût du <i>dolo</i> à Zone 1 (ZN) et Samandin (S), et du moût du <i>pito</i> à Nyankpala (N) et Tamale Town (Tt).....	76
Figure 10 : pH et acidité titrable (TA) durant la production du moût du <i>dolo</i> à Zone 1 (ZN) et Samandin (S), et du moût du <i>pito</i> à Nyankpala (N) et Tamale town (Tt).....	76
Figure 11a: Gels d'agarose des produits ITS-PCR/RFLP d'espèces dominantes de bactéries lactiques isolées du brassage du <i>dolo</i> à Zone 1 (Ouagadougou, Burkina Faso).....	84
Figure 11b: Gels d'agarose des produits ITS-PCR/RFLP d'espèces dominantes de bactéries lactiques isolées du brassage du <i>pito</i> à Nyankpala (Tamale, Ghana).....	85
Figure 12: Gels d'agarose des produits PFGE d'espèces dominantes de bactéries lactiques isolées du brassage du <i>dolo</i> à Zone 1 (Ouagadougou, Burkina Faso).....	86
Figure 13: Dendrogramme construit sur la base des coefficients de similarité "Dices coefficient of similarity with the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages (UPGMA)" des profils PFGE-Asc I d'isolats de <i>Lact. fermentum</i> , <i>Lact. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> et <i>Ped. acidilactici</i> , impliqués dans la production du moût du <i>dolo</i> et du <i>pito</i> à Zone1 (ZN) et à Nyankpala N).....	87
Figure 14: Inhibition de la croissance de <i>Staph. aureus</i> entérotoxine A (14a) et <i>Staph. aureus</i> entérotoxines A et B (14b) par des isolats de <i>Lact. fermentum</i> .....	96
Figure 15 (A & B) : Distribution des isolats de <i>Lact. fermentum</i> à 3h (A) et à 6h (B) de fermentation pendant les essais de fermentation de l'extrait de malt de sorgho.....	99

Figure 15(C&D) : Distribution des isolats de <i>Lact. fermentum</i> à 9h (C) et à 12h (D) de fermentation pendant les essais de fermentation de l'extrait de malt de sorgho.....	100
Figure 15 (E &F) : Distribution des isolats de <i>Lact. fermentum</i> à 15h (E) et à 24h (F) de fermentation pendant les essais de fermentation de l'extrait de malt de sorgho.....	101
Figure 16: Evolution du taux d'acidification des isolats de <i>Lact. fermentum</i> répartis en groupes durant les essais de fermentation de l'extrait de malt de sorgho.....	102
Figure 17: Distribution des isolats de <i>Lact. fermentum</i> appartenant aux groupes G1, G2, G3 et G4 selon les sites de production Zone 1(ZN), Samandin (S), Nyankpala (N) et Tamale Town (Tt).....	102
Figure 18: Diagramme de production du <i>dolo</i> par double fermentation lactique puis alcoolique du moût avec inoculation de <i>Lact. fermentum</i> et la levure L4.....	120
Figure 19 : Diagramme de production du <i>dolo</i> par co-fermentation lactique et alcoolique du moût avec inoculation de <i>Lact. fermentum</i> et la levure L4.....	121
Figure 20 : Evolution de la biomasse de <i>Lact. fermentum</i> ZN4.1, SD1.8, SF6.1a et SF8.2 pendant la co-fermentation lactique et alcoolique du moût.....	123
Figure 21 : Evolution de la biomasse de la levure L4 pendant la co-fermentation lactique et alcoolique de moûts par <i>Lact. fermentum</i> et la levure L4 .....	123
Figure 22 : Evolution du pH pendant la co-fermentation lactique et alcoolique de moûts par <i>Lact. fermentum</i> et la levure L4 .....	124
Figure 23 : Evolution de la biomasse de <i>Lact. fermentum</i> ZN4.1, SF6.1a, SD1.8 et SF8.2 durant la fermentation lactique du moût.....	126
Figure 24 : Evolution du pH durant la fermentation lactique de moûts par <i>Lact. fermentum</i> ZN4.1, SF6.1a, SD1.8 et SF 8.2.....	126
Figure 25 : Evolution de la biomasse de la levure L4 pendant la fermentation alcoolique de moûts préalablement fermentés par <i>Lact. fermentum</i> ZN 4.1, SD1.8, SF6.1a et SF8.2.....	127
Figure 26 : Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique (par la levure L4) de moûts préalablement fermentés par <i>Lact. fermentum</i> ZN 4.1, D1.8, SF6.1a et SF8.2.....	127
Figure 27 : Images illustrant l'environnement de production du <i>dolo</i> à Ouagadougou (Burkina Faso) .....	161
Figure 28: Images illustrant l'environnement de production du <i>pito</i> à Tamale (Ghana).....	162

## Liste des Tableaux

Tableau I: Composition globale des grains entiers de céréales.....	6
Tableau II: Produits fermentés traditionnels à base de céréales.....	8
Tableau III: Composition en nutriments du grain de sorgho.....	17
Tableau IV: Principales caractéristiques phénotypiques des bactéries lactiques.....	30
Table Va: pH and dominant microorganisms counts during the malting of sorghum grains at two production sites in Tamale .....	156
Table Vb: pH and dominant microorganisms counts during malting of sorghum grains at two production sites in Ouagadougou .....	157
Tableau VI: Caractéristiques des produits ITS-PCR/RFLP de 106 isolats de bactéries lactiques provenant des sites de maltage du sorgho de Nyankpala et Tamale town.....	55
Tableau VII: Identification de 106 isolats de bactéries lactiques provenant des sites de maltage du sorgho de Nyankpala et Tamale town.....	55
Table VIII: Pattern of carbohydrate utilization of dominant lactic acid bacteria isolated from malting processing of sorghum grain .....	163
Tableau IX : Distribution (% d'isolats) des espèces dominantes de bactéries lactiques dans les sites de maltage du sorgho à Nyankpala (N) et Tamale town (Tt).....	60
Tableau X: Activité antimicrobienne de 106 isolats de bactéries lactiques associés au maltage traditionnel du sorgho à Tamale (Nord Ghana) .....	61
Table XIa: Dominant aerobic mesophilic bacteria counts (cfu/g) on PCA media during the brewing of <i>dolo</i> at the production sites of Ouagadougou .....	158
Table XIb: Dominant aerobic mesophilic bacteria counts (cfu/g) on PCA media during the brewing of <i>pito</i> at the two production sites of Tamale .....	158
Table XIc: Yeast count (cfu/g) on Malt agar media during the brewing of <i>dolo</i> at the production sites of Ouagadougou and Tamale .....	159
Table XId: pH, titratable acidity and LAB count during the production of <i>dolo</i> at the two production sites of Ouagadougou .....	160
Table XIe: pH and LAB count during the production of <i>pito</i> in the two production sites of Tamale .....	160

Tableau XII: Produits ITS-PCR/RFLP de 350 isolats de bactéries lactiques provenant des sites de production du <i>dolo</i> (Ouagadougou, Burkina Faso) et du <i>pito</i> (Tamale, Ghana).....	79
Tableau XIII: Identification par le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S des isolats de bactéries lactiques impliqués dans le brassage du <i>dolo</i> à Ouagadougou et du <i>pito</i> à Tamale.....	80
Table XIV: Pattern of carbohydrate utilization of dominant lactic acid bacteria involved in <i>dolo</i> and <i>pito</i> processing .....	164
Tableau XV: Distribution (%) des espèces de bactéries lactiques tout au long du brassage du <i>dolo</i> et du <i>pito</i> par sites et étapes de production.....	83
Tableau XVI: Activité antimicrobienne de 264 isolats de <i>Lactobacillus fermentum</i> envers des souches indicatrices de germes pathogènes.....	95
Tableau XVII: Répartition de 230 isolats of <i>Lactobacillus fermentum</i> selon leur activité acidifiante durant les essais de fermentation de l'extrait de malt de sorgho, pH 4,89 ± 0,20.....	98
Tableau XVIII: Caractéristiques technologiques des souches de <i>Lact. fermentum</i> sélectionnées pour la conduite de la fermentation lactique du moût du <i>dolo</i> .....	111
Tableau XIX: Caractéristiques de la levure L4 utilisée pour la fermentation alcoolique du moût .....	112
Tableau XX: Concentrations moyennes en cellules viables (log ufc/ml) des inocula de <i>Lact. fermentum</i> et de la levure L4 utilisés pour les essais de fermentation.....	118
Tableau XXI: Paramètres mesurés pendant la préparation du substrat utilisé pour les essais de co-fermentation lactique et alcoolique.....	122
Tableau XXIIa: pH et biomasse de bactérie lactique pendant la fermentation lactique en unité de production du <i>dolo</i> .....	128
Tableau XXIIb: pH et biomasse de levure pendant la fermentation alcoolique de moûts acidifiés en unité de production de <i>dolo</i> .....	129
Tableau XXIII : Liste des souches de <i>Lact. fermentum</i> en fonction de leur pouvoir acidifiant.....	165
Tableau XXIV: Liste des souches de <i>Lact. fermentum</i> ayant des propriétés technologiques intéressantes ( <i>pouvoir acidifiant, activité antimicrobienne, capacité à produire des amylases et des polysaccharides exocellulaires</i> ) .....	166

# SOMMAIRE

	Page
Dédicace.....	i
Remerciements.....	ii
Résumé.....	iv
Abstract .....	vi
Liste des Figures .....	viii
Liste des Tableaux.....	x
<b>SOMMAIRE</b> .....	xii
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE : PRODUITS TRADITIONNELS FERMENTES A BASE DE CEREALES ET BACTERIES LACTIQUES</b> .....	5
<b>I.1 Les produits fermentés à base de céréales et la microflore associée</b> .....	6
<b>I.2 Les bières traditionnelles Africaines</b> .....	11
I.2.1 La technologie du <i>dolo</i> et du <i>pito</i> .....	12
I.2.1.1 La matière première : le sorgho.....	12
a) <i>Description</i> .....	13
b) <i>Distribution et production</i> .....	14
c) <i>Structure et constitution du grain de sorgho</i> .....	14
d) <i>Composition du grain de sorgho</i> .....	15
I.2.1.2 Le maltage et son impact sur le grain de sorgho.....	17
I.2.1.3 Le brassage traditionnel du <i>dolo</i> et du <i>pito</i> .....	20
<b>I.3 Impact de la fermentation lactique sur la qualité des produits céréaliers</b> .....	20
<b>I.4 Les bactéries lactiques</b> .....	22
I.4.1 Généralités.....	22
I.4.2 Habitat.....	23
I.4.3 Taxonomie et classification des principaux genres de bactéries lactiques.....	24
I.4.3.1 Le genre <i>Lactobacillus</i> .....	25
I.4.3.2 Le genre <i>Pediococcus</i> .....	28
I.4.3.3 Le genre <i>Streptococcus</i> .....	29

I.4.3.4 Le genre <i>Lactococcus</i> .....	31
I.4.3.5 Le genre <i>Enterococcus</i> .....	31
I.4.3.6 Le genre <i>Leuconostoc</i> .....	32
I.4.3.7 Le genre <i>Weisseilla</i> .....	32
I.4.4 Méthodes d'identification des bactéries lactiques .....	33
I.4.4.1 Méthodes basées sur les caractéristiques phénotypiques .....	33
I.4.4.2 Méthodes basées sur les caractéristiques génétiques.....	36
I.4.4.3 La taxonomie numérique.....	40
I.4.4.4 La taxonomie polyphasique.....	41
<b>I.5 Les risques liés à la fermentation lactique</b> .....	42
<b>I.6 La sélection de cultures starter pour l'optimisation de la fermentation</b> .....	43

## CHAPITRE II : IDENTIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES DOMINANTS ASSOCIEES AU MALTAGE

<b>TRADITIONNEL DU SORGHO</b> .....	46
Résumé.....	47
Introduction.....	48
<b>II .1 Matériel et Méthodes</b> .....	49
II .1.1 Site d'étude et échantillonnage.....	49
II.1.2 Dénombrement microbien, isolement/purification et caractérisation phénotypique des isolats bactériens .....	50
II.1.3 Caractérisation génotypique et identification des isolats de bactéries lactiques .....	50
II.1.4 Détermination des propriétés technologiques des isolats de bactéries lactiques.....	51
<b>II. 3 Résultats</b> .....	52
II.3.1 Le maltage traditionnel des grains de sorgho dans les sites étudiés.....	52
II.3.2 Evolution du pH et des microorganismes dominants durant le maltage des grains de sorgho .....	53
II.3.3 Caractéristiques génotypiques et identification des isolats de bactéries lactiques .....	54
II.3.3.1 <i>Les profils ITS-PCR/RFLP des isolats de bactéries lactiques</i> .....	54
II.3.3.2 <i>Les espèces dominantes de bactéries lactiques identifiées</i> .....	57
II.3.4 Profils de fermentation des hydrates de carbone des espèces identifiées .....	58
II.3.5 Distribution des espèces identifiées selon les sites et les étapes du procédé de maltage.....	59

II.3.6 Propriétés technologiques des isolats de bactéries lactiques.....	59
<i>II.3.6.1 L'activité antimicrobienne des isolats .....</i>	<i>59</i>
<i>II.3.6.2 L'activité amylasique des isolats .....</i>	<i>61</i>
<i>II.3.6.3 La capacité des isolats à produire des polysaccharides exocellulaires (EPSs).....</i>	<i>61</i>
<b>II.4 Discussion .....</b>	<b>62</b>

### CHAPITRE III : IDENTIFICATION ET ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES BACTERIES LACTIQUES

<b>DOMINANTES IMPLIQUEES DANS LE BRASSAGE TRADITIONNEL DU DOLO ET DU PITO .....</b>	<b>65</b>
Résumé.....	66
Introduction.....	67
<b>III.1 Matériel et Méthodes.....</b>	<b>68</b>
III.1.1 Sites et matériel d'étude.....	68
<i>III.1.1.1 Suivi du brassage traditionnel du dolo et du pito.....</i>	<i>68</i>
<i>III.1.1.2 Echantillonnage.....</i>	<i>68</i>
III.1.2 Analyses physico-chimiques .....	69
III.1.3 Analyses microbiologiques.....	69
<i>III.1.3.1 Dénombrement des microorganismes dominants.....</i>	<i>69</i>
<i>III.1.3.2 Isolement/ purification et détermination des caractéristiques phénotypiques des isolats dominants .....</i>	<i>69</i>
<i>III.1.3.3 Caractérisation génotypique et identification des isolats de bactéries lactiques.....</i>	<i>70</i>
<b>III.2 Résultats .....</b>	<b>71</b>
III.2.1 Le brassage traditionnel du <i>dolo</i> et du <i>pito</i> dans les sites étudiés.....	71
III.2.2 Evolution du pH, de l'acidité titrable et de la population microbienne pendant le brassage du <i>dolo</i> et du <i>pito</i> .....	75
III.2.3 Les espèces dominantes de bactéries lactiques identifiées.....	77
<i>III.2.3.1 Les profils ITS-PCR/RFLP des isolats.....</i>	<i>77</i>
<i>III.2.3.2 L'identification des isolats par l'analyse de la séquence partielle de l'ADN .....</i>	<i>77</i>
<i>III.2.3.3 Les profils de fermentation des sucres des espèces dominantes identifiées.....</i>	<i>78</i>
<i>III.2.3.4 La distribution des espèces dominantes selon les sites et les étapes de production.....</i>	<i>82</i>
<i>III.2.3.5 La biodiversité des isolats .....</i>	<i>82</i>
<b>III.3 Discussion .....</b>	<b>88</b>

<b>CHAPITRE IV: DETERMINATION DES PROPRIETES TECHNOLOGIQUES DES ISOLATS DE LACTOBACILLUS FERMENTUM IMPLIQUES DANS LA FERMENTATION NATURELLE DU MOÛT DU DOLO ET DU PITO</b> .....	90
Résumé.....	91
Introduction.....	92
<b>IV.1 Matériel et Méthodes</b> .....	93
IV.1.1 Origine des isolats de <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	93
IV.1.2 Recherche de l'activité antimicrobienne des isolats de <i>Lact. fermentum</i> .....	93
IV.1.3 Détermination du pouvoir acidifiant des isolats de <i>Lact. fermentum</i> .....	93
IV.1.4 Recherche de la production de polysaccharides exocellulaires (EPSs) par les isolats.....	93
IV.1.5 Recherche de l'activité amylasique des isolats de <i>Lact. fermentum</i> .....	94
<b>IV.2 Résultats</b> .....	94
IV.2.1 L'activité antimicrobienne des isolats .....	94
IV.2.2 Le pouvoir acidifiant des isolats de <i>Lact. fermentum</i> .....	95
IV.2.3 La capacité des isolats de <i>Lact. fermentum</i> à produire des polysaccharides exocellulaires (EPSs).....	103
IV.2.4 La capacité des isolats de <i>Lact. fermentum</i> à produire des amylases.....	103
<b>IV.3 Discussion</b> .....	103
<b>CHAPITRE V: UTILISATION DE SOUCHES SELECTIONNEES DE LACTOBACILLUS FERMENTUM ET UN ISOLAT DE LEVURE COMME CULTURES STARTER DANS LA PRODUCTION DU DOLO</b> .....	106
Résumé.....	107
Introduction.....	108
<b>V.1 Matériel et Méthodes</b> .....	109
V.1.1 Préparation des inocula de <i>Lact. fermentum</i> pour la conduite de la fermentation lactique du moût.....	110
V.1.2 Préparation des inocula de levure <i>L4</i> pour la conduite de la fermentation alcoolique du moût du moût .....	111
V.1.3 Les essais de production du <i>dolo</i> au laboratoire.....	113
V.1.3.1 Utilisation des souches sélectionnées en double fermentation lactique puis alcoolique du moût.....	113
a) Préparation du substrat et conduite de la fermentation lactique.....	113
b) Préparation du moût acidifié par fermentation lactique et conduite de la fermentation alcoolique.....	114



V.1.3.2 Utilisation des souches sélectionnées en co-fermentation lactique et alcoolique du moût.....	114
a) Préparation du substrat pour la conduite de la co-fermentation.....	114
b) Ensemencement et conduite de la co-fermentation lactique et alcoolique.....	115
V.1.4 Les essais réalisés en unité de production du <i>dolo</i> .....	115
V.1.4.1 Préparation du substrat pour la fermentation lactique.....	116
V.1.4.2 Ensemencement et conduite de la fermentation lactique.....	116
V.1.4.3 Préparation du moût acidifié et conduite de la fermentation alcoolique.....	116
V.1.5 Analyse des paramètres microbiologiques et physico-chimiques.....	117
V.1.6 Evaluation sensorielle des échantillons de <i>dolo</i> .....	117
V.1.6.1 Evaluation des échantillons de <i>dolo</i> produits au laboratoire.....	117
V.1.6.2 Evaluation des échantillons de <i>dolo</i> produits en unité de production .....	118
<b>V. 2 Résultats</b> .....	118
V.2.1 Caractéristiques des inocula des souches utilisées .....	118
V.2.2 Diagrammes de production du <i>dolo</i> avec les souches sélectionnées.....	119
V.2.3 Evolution des paramètres physico-chimiques durant la préparation du substrat pour la conduite de la co-fermentation .....	119
V.2.4 Evolution des paramètres physico-chimiques et microbiologiques pendant les essais de fermentation au laboratoire .....	122
a) <i>pH</i> et développement des microorganismes pendant la co-fermentation lactique et alcoolique du moût .....	122
b) <i>pH</i> et développement des microorganismes au cours de la double fermentation lactique puis alcoolique du moût .....	125
V.2.5 Paramètres physico-chimiques et microbiologiques pendant les essais réalisés en unité de production .....	128
V.2.6 Appréciation des échantillons de <i>dolo</i> par le jury de dégustation.....	129
V.2.6.1 Les échantillons de <i>dolo</i> produits au laboratoire.....	129
V.2.6.2 Les échantillons de <i>dolo</i> produits en unité de production .....	130
<b>V.3 Discussion</b> .....	131
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	135
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	138
<b>ANNEXES</b> .....	155

## INTRODUCTION GENERALE

La fermentation est l'une des plus anciennes méthodes de transformation/conservation des produits alimentaires utilisée par l'Homme. Des méthodes de fermentation du lait, de la viande, du poisson, des légumes et des céréales ont été décrites depuis des civilisations et les écrits les plus récents apparus au Moyen Orient, datent de 6000 ans avant Jésus Christ (Blandino *et al.*, 2003).

La fermentation résulte de l'activité microbienne, laquelle a une grande incidence d'une part sur la qualité intrinsèque de la denrée alimentaire qui peut être améliorée ou altérée et d'autre part sur sa qualité sanitaire et sa durée de conservation. Ainsi, Steinkraus (1995) définissait les produits fermentés comme des substrats alimentaires envahis par des microorganismes comestibles dont les enzymes caractéristiques transforment les macromolécules en métabolites non toxiques avec l'apparition de saveurs, d'arômes et de textures agréables et attrayants pour la consommation humaine; par contre si les produits issus de l'action enzymatique des microorganismes dégagent des odeurs désagréables, indésirables ou des saveurs non attrayants, ou que ces produits soient toxiques ou soient à l'origine de maladies, ils sont alors dits altérés ou pourris. Diverses fermentations sont mises en œuvre dans le domaine alimentaire et les principales sont:

- la fermentation alcoolique par l'action des levures dans le cas des vins, bières modernes, bières traditionnelles,
- la fermentation lactique avec les bactéries lactiques comme principaux microorganismes, qui concerne les produits laitiers, les produits à base de céréales, les produits végétaux,
- la fermentation acétique par des bactéries du genre *Acetobacter* pour la production du vinaigre,
- la fermentation alcaline résultant de la production de peptides, d'acides aminés et d'ammoniaque par des bactéries du genre *Bacillus* dans le cas des poissons et des graines légumineuses (Steinkraus, 2002).

De nombreux effets bénéfiques sont attribués à la fermentation de manière générale et à la fermentation lactique en particulier. Ce sont : l'enrichissement des aliments en nutriments essentiels, la sécurité sanitaire des aliments, l'augmentation de la durée de conservation, l'amélioration de la digestibilité et de la comestibilité, l'amélioration des caractéristiques organoleptiques, la réduction du volume et de la durée de cuisson (Uzogara *et al.*, 1990 ; Steinkraus, 1995; Simango, 1997; Holzappel, 1997).

De nos jours, l'importance de la fermentation dans l'alimentation humaine se traduit par la diversité de produits fermentés développés tant au niveau des ménages que des unités artisanales et industrielles (Motarjemi, 2002). L'émergence des aliments fermentés est due non seulement à leurs avantages sur le plan conservation et sécurité sanitaire mais aussi à leurs attributs nutritionnel et sensoriel appréciés par les consommateurs. Dans la plupart des pays en développement, les aliments fermentés, obtenus essentiellement par des méthodes traditionnelles, contribuent jusqu'à plus de 60% de l'alimentation des populations (Holzapfel *et al.*, 1995). Selon les zones géographiques et les habitudes alimentaires et culturelles, divers aliments fermentés comme par exemple les pâtes, bouillies, boissons alcoolisées et non alcoolisées, pains, condiments, viandes, poissons, légumes et produits laitiers, sont produits à travers le monde à partir de matières premières comestibles à l'état brut ou non (Campbell-Platt, 1987; Steinkraus, 1996). Ces produits sont issus d'une part, de technologies traditionnelles par fermentation naturelle non contrôlée où les microorganismes impliqués proviennent de la flore originelle du substrat ou du matériel utilisé et d'autre part, de technologies améliorées par fermentation contrôlée avec l'utilisation de cultures microbiennes sélectionnées appelées cultures starter.

Dans les régions tropicales et subtropicales, la fermentation joue un rôle essentiel dans l'alimentation des populations. Elle sert de substitut à la réfrigération ou à tout autre moyen non disponible pour une bonne conservation des aliments (Holzapfel *et al.*, 1995). Les céréales, les tubercules et les graines de légumineuses sont les principales matières premières utilisées en Afrique, bien que d'autres produits comme le lait, le poisson et la viande soient également fermentés. Dans la majorité des cas, les produits fermentés à base de céréales sont typiquement de fermentation lactique ; c'est le cas par exemple des pains de seigle aigres européens, des pains plats asiatiques, des bouillies à base de céréales fermentées, des boulettes de pâte fermentée, des boissons non alcoolisées et des bières traditionnelles légèrement alcoolisées d'Afrique et d'Amérique de Sud. De ces exemples, les levures jouent également un rôle, mais la fermentation lactique contribue plus aux avantages technologique, nutritionnel, organoleptique et sanitaire des produits (Salovaara, 2004).

Les bières traditionnelles restent de loin les boissons fermentées les plus populaires en Afrique de l'Ouest, comme le *dolo* et le *pito*, deux boissons similaires produites et consommées au Burkina Faso, au Mali, au Ghana, au Togo et au Nigéria. Le sorgho (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*) est la principale matière première utilisée pour leur production. Légèrement alcoolisé (2-3% v/v), le *pito* contient des sucres, des acides aminés, des protéines, des vitamines et des acides organiques (Ekundayo, 1969; Bansha, 1990; Sefa-Dedeh, 1991). Le moût de la

bière traditionnelle prêt pour la fermentation alcoolique, est également consommé comme boisson non alcoolisée par les populations locales. Ces boissons contribuent à l'alimentation et à l'équilibre nutritionnel des populations locales, ainsi qu'à leur bien être social, culturel et économique (Odunfa, 1985; Sefa-Dedeh et Asante, 1988; Bougouma, 2002). Au Burkina Faso de même qu'au Ghana, la production du *dolo* et du *pito* demeure de nos jours une des principales activités féminines génératrices de revenus substantiels qui contribuent aux systèmes économiques des pays. La technologie du *dolo* et du *pito* relève d'un savoir-faire traditionnel familial et comprend deux grandes étapes: le maltage des grains de sorgho impliquant germination et séchage, puis le brassage de la bière traditionnelle à partir du malt de sorgho. Les principales opérations du brassage décrites dans la littérature sont: le broyage/concassage du malt de sorgho, l'empâtage, la saccharification, la cuisson, le refroidissement et la fermentation alcoolique du moût final par addition de levure locale provenant de la production précédente (Sefa-Dedeh, 1991; Mandjeka, 2002). Les travaux antérieurs qui ont traité de la microbiologie du *dolo* et du *pito* ont surtout porté sur la fermentation alcoolique avec la caractérisation des levures dominantes (Sefa-Dedeh and Asante, 1988; Demuyakor and Ohta, 1991; Konlani *et al.*, 1996; Sefa-Dedeh *et al.*, 1999; van der Aa Kühle *et al.*, 2001; Glover *et al.*, 2005). Certains auteurs ont évoqué une fermentation mixte dans la production de la bière traditionnelle Sud Africaine, qui associe levures et bactéries lactiques, avec *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus* comme principaux genres responsables de l'acidification du moût (Novellie et De Schaepdrijver, 1986; Haggblade et Holzapfel, 1989; Steinkraus, 1996). *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus* ont également été identifiés dans le *chibuku*, une bière traditionnelle du Zimbabwe (Togo *et al.*, 2002).

A notre connaissance, très peu d'études détaillées ont été réalisées et/ou publiées sur l'implication des bactéries lactiques dans la technologie du *dolo* et du *pito*, notamment l'acidification du moût pendant le brassage. En outre, le problème majeur des technologies traditionnelles de fermentation en Afrique et au Burkina Faso en particulier, est la faible maîtrise du processus de fermentation et de l'hygiène de l'environnement de production. La fermentation est naturelle non contrôlée et les principales contraintes sont: un faible rendement avec une importante perte de matières, une variabilité de la qualité et de la stabilité des produits d'une production à l'autre et des risques de contamination par des microorganismes et/ou métabolites indésirables, d'où des risques sanitaires pour le consommateur. Ainsi, comme certains auteurs ont souligné, la disponibilité de connaissances scientifiques détaillées sur les procédés et les microorganismes associés aux technologies traditionnelles de fermentation, le développement de cultures starter dans les unités artisanales et l'application des règles d'hygiène, constituent une

approche appréciable pour contrôler, optimiser les conditions de fermentation et contribuer de manière significative à améliorer ces technologies traditionnelles (Sanni, 1993; Kimaryo *et al.*, 2000; Holzapfel, 2002; Rolle and Satin, 2002). D'où l'objet et l'intérêt de ce travail.

### **Objectifs de l'étude**

L'objectif global est d'améliorer la technologie et la qualité de la bière traditionnelle (*dolo, pito*), notamment la méthode d'acidification du moût par l'utilisation de cultures starter de bactéries lactiques.

Les objectifs spécifiques sont:

- Collecter, caractériser et identifier les isolats dominants de bactéries lactiques associés au maltage traditionnel du sorgho,
- Collecter, caractériser et identifier les isolats dominants de bactéries lactiques impliqués dans le brassage traditionnel du *dolo* et *pito*, notamment la phase d'acidification du moût,
- Déterminer les propriétés technologiques des espèces dominantes de bactéries lactiques identifiées,
- Sélectionner des souches sur la base de leurs propriétés technologiques puis les utiliser comme cultures starter pour une fermentation contrôlée du moût,
- Constituer une banque de données scientifiques sur la technologie traditionnelle du *dolo* et *pito* et la microflore associée.

Le présent mémoire de thèse d'Etat comporte cinq (5) chapitres : un (1) chapitre sur la revue de littérature et quatre (4) chapitres sur les travaux expérimentaux dont les résultats sont publiés sous forme d'articles scientifiques joints en annexe.

**CHAPITRE I**

**REVUE DE LITERATURE : PRODUITS TRADITIONNELS  
FERMENTES A BASE DE CEREALES ET BACTERIES LACTIQUES**

## I.1. Les produits fermentés à base de céréales et la microflore associée

De par leur composition (Tableau I), les céréales constituent un milieu favorable pour les fermentations microbiennes. Elles sont riches en hydrates de carbone, lesquels sont utilisés comme source de carbone et d'énergie par les microorganismes. La teneur en sucres libres dans les grains de céréales parvenus à maturité qui est généralement de l'ordre de 1 à 3 % (Salovaara, 2004) est suffisante pour initier le processus de fermentation. Par la suite, les amylases endogènes des grains produisent suffisamment de sucres simples à partir des polysaccharides dans les conditions favorables de fermentation. Les céréales contiennent également des protéines, des lipides, des minéraux, des vitamines, des stérols et autres facteurs de croissance qui favorisent le développement des microorganismes mêmes les plus exigeants comme les bactéries lactiques. Les grains de céréales bruts possèdent une microflore originelle constituée de levures, de moisissures, d'entérobactéries, de bactéries lactiques, de bactéries aérobies sporulées,....

**Tableau I:** Composition globale des grains entiers de céréales (Salovaara et Simonson, 2003)

Constituants	Teneur (% ms)
- Polysaccharides totaux	70-80
.Amidon	45-77
.Fibres brutes y compris lignine	9-15
.hydrates de carbone de faible poids moléculaire (fructose, glucose, saccharose, raffinose ...)	2-5
- Protéines	8-15
- Lipides	2-6
- Cendres (sels minéraux totaux)	1,5-3

ms : matière sèche

La technologie des produits fermentés à base de céréales comprend généralement des opérations de trempage et/ou broyage et de mélange à l'eau au cours desquelles une hydrolyse par les enzymes endogènes, puis une fermentation par les microorganismes sont inévitables. Les grains après un nettoyage subissent un trempage à l'eau de quelques heures à quelques jours pendant lequel un développement microbien dominé par des bactéries lactiques est observé; ce trempage permet d'obtenir une activité de l'eau ( $A_w$ ) supérieure à 0,90, favorable à la croissance

des bactéries (Adams and Moss, 2008). Dans de tel cas, les amylases endogènes des grains génèrent des sucres fermentescibles qui servent de source d'énergie pour ces bactéries. Les flores de contaminations (moisissures, entérobactéries) peuvent être initialement présentes à des concentrations élevées mais sont généralement éliminées au cours de la fermentation lactique (Salovaara, 2004).

De nombreux produits fermentés à base de céréales (riz, blé, maïs, mil, sorgho) sont utilisés comme épices, condiments, boissons, petits déjeuners, aliments de sevrage, aliments légers ou aliments de base dans l'alimentation des populations (Tableau II). La microflore associée est complexe et la nature de la flore dominante développée au cours de la fermentation dépend d'une part de la composition, de l'activité de l'eau et du pH du substrat et d'autre part de la température. La fermentation naturelle non contrôlée implique des cultures mixtes comprenant bactéries, levures et moisissures, qui interviennent parallèlement ou de manière séquentielle au cours de la fermentation. Dans les substrats riches en sucres, les bactéries dominent principalement dans la phase initiale du processus de fermentation à cause de leur taux de croissance relativement élevé, suivies des levures et des moisissures (Holzapfel, 2002). Les espèces bactériennes dominantes appartiennent généralement aux genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Micrococcus* et *Bacillus*. Quant aux moisissures, les espèces fréquemment observées appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Trichothecium*. Les levures communément rencontrées sont des genres *Saccharomyces*, *Candida* et *Torula* (Steinkraus, 1998).

Les espèces de levures sont généralement acide-tolérantes et forment une symbiose stable avec les bactéries lactiques notamment les lactobacilles. La concentration des levures reste cependant inférieure, généralement 50 à 100 fois plus faible que celle des lactobacilles (Salovaara, 2004). Les levures produisent des acides aminés, des vitamines et d'autres facteurs de croissance indispensables au développement des bactéries lactiques (Gobbetti *et al.*, 1994a). Dans la plupart des cas, les bactéries lactiques assurent la régulation du processus de fermentation des produits alimentaires, en produisant des substances qui inhibent la croissance de microorganismes pathogènes ou indésirables (Conway, 1996).



**Tableau II:** Produits fermentés traditionnels à base de céréales (Sources: Soni et Sandhu, 1990; Inyang et Dabot, 1997; Adams, 1998; FAO, 1999 ; Nout et Sarkar, 1999; Blandino *et al.*, 2003 ; Glover *et al.*, 2005 ; Sawadogo-Linagni *et al.* 2007 )

Nom local	Matière première	Microorganismes impliqués	Nature /Utilisation	Pays/Origine
<i>Adai</i>	Céréales et légumineuses	<i>Pediococcus, Streptococcus, Leuconostoc</i>	Petit déjeuner, snack (casse-croûte)	Inde
<i>Anarshe</i>	Riz	Bactéries lactiques	Petit déjeuner, snack	Inde
<i>Atole</i>	Maïs	Bactéries lactiques	Bouillie à base de pâte fermentée	Mexique
<i>Banku</i>	Maïs, maïs et manioc	Bactéries lactiques, moisissures	Pâte fermentée cuite, aliment de base	Ghana
<i>Bière malawa et zambienne</i>	Maïs	Bactéries, levures	Boisson alcoolisée (bière traditionnelle)	Ouganda, Zambie
<i>Bière de Kaffir</i>	Grains de kaffir (sorgho)	<i>Lactobacillus, Leuconostoc, Saccharomyces cerevisiae, Kloeckera</i>	Boisson alcoolisée	Afrique du Sud
<i>Bouza</i>	Blé	Bactéries lactiques, levures	Boisson alcoolisée acidulée	Egypte, Turquie
<i>Bousa</i>	Maïs et mil	Bactéries lactiques, levures	Boisson alcoolisée	Kenya
<i>Boza</i>	Blé, mil, maïs, autre céréale	<i>Lactobacillus, Leuconostoc, S. cerevisiae, Candida, Geotricum</i>	Boisson épaisse, sucrée et légèrement aigre	Turquie, Bulgarie, Roumanie
<i>Brembali</i>	Riz	<i>Mucor, Candida</i>	Boisson alcoolisée (bière de riz)	Indonésie
<i>Burukutu</i>	Sorgho	<i>Saccharomyces, Leuconostoc, Candida, Acetobacter</i>	Boisson alcoolisée à flaveur vinaigrée	Nigéria, Bénin, Ghana
<i>Busa</i>	Riz, mil	<i>Lactobacillus, Saccharomyces</i>	Boisson liquide	Syrie, Egypte
<i>Busaa</i>	Maïs	<i>Lactoacillus, S. cerevisiae, Penicillium, Candida</i>	Boisson alcoolisée	Afrique de l'Est
<i>Chicha</i>	Maïs	<i>S. cerevisiae, Lactobacillus, Leuconostoc, Acetobacter, Aspergillus, Penicillium</i>	Pâte consommée avec une sauce légume	Pérou
<i>Dhokla</i>	Riz ou blé	<i>Leuconostoc, Streptococcus Torulopsis</i>	Gâteau cuit à la vapeur, petit déjeuner, snack	Inde
<i>Doro</i>	Mil	Levures, bactéries	Boisson colloïdale alcoolisée	Zimbabwe
<i>Dolo</i>	Sorgho, mil, maïs	<i>S. cerevisiae, Lact fermentum, Lact. delbrueckii, Pediococcus spp.</i>	Boisson alcoolisée et acidulée	Burkina Faso

**Tableau II** (suite)

Nom local	Matière première	Microorganismes impliqués	Nature /Utilisation	Pays/Origine
<i>Dosa</i>	Riz	<i>Leuconostoc, Streptococcus, Torulopsis</i>	Galettes, petit déjeuner, snack	Inde
<i>Ilambazi-okubilisa</i>	Maïs	Bactéries lactiques, levures et moisissures	Bouillie de sevrage	Zimbabwe
<i>Enjera</i>	Sorgho, maïs, blé	<i>Pullaria, Aspergillus, Penicillium, Rhodotorula., Hormodendrum, Candida</i> , bactéries	Aliment de base ressemblant au pain	Ethiopie
<i>Jamin-bang</i>	Maïs	Levures, bactéries	Pâte consommée avec des légumes	Brésil
<i>Kenkey</i>	Maïs	<i>Lactobacillus, Lact. fermentum Saccharomyces, Penicillium, Aspergillus, Fusarium</i>	Pâte fermentée cuite à la vapeur, aliment de base	Ghana
<i>Khaomak</i>	Riz	<i>Rhizopus, Mucor, Saccharomyces, Hansenula</i>	Boisson alcoolisée sucrée	Thaïland
<i>Kirsa</i>	Sorgho, mil	<i>Lactobacillus, Acetobacter., S. cerevisiae</i>	Aliment de base ressemblant au pain	Soudan, Irak
<i>Koko</i>	Maïs	<i>Lactobacillus, Lact. fermentum, S. cerevisiae,</i>	Bouillie, aliment de base	Ghana
<i>Kunun- zaki</i>	Mil, sorgho	<i>Lactobacillus, Bacillus, Enterobacter, Saccharomyces</i>	Boisson fermentée non alcoolisée, petit déjeuner	Nigéria
<i>Mahewu</i>	Maïs, sorgho, mil	<i>Streptococcus, Lactobacillus, Lactococcus</i>	Aliment de base	Afrique du Sud
<i>Mawè</i>	Maïs	<i>Lactobacillus, Lact. fermentum Lactococcus, Pediococcus, Leuconostoc, levures</i>	Aliment de base utilisé pour la préparation de plusieurs mets	Bénin
<i>Mangisi</i>	Mil	<i>Bactéries lactiques</i>	Boisson non alcoolisée, sucrée et aigre	Zimbabwe
<i>Me</i>	Riz	<i>Bactéries lactiques</i>	aliment de base pour la préparation de mets aigres	Vietnam
<i>Merissa</i>	Sorgho, mil	<i>Bactéries lactiques, bactéries acétiques, Saccharomyces</i>	Boisson alcoolisée	Soudan
<i>Miso</i>	Riz et soja, Riz, orge, céréales	<i>Aspergillus oryzae, Torulopsis, Lactobacillus</i>	Pâte utilisée pour assaisonnement	Japon, Chine
<i>Munkoyo</i>	Grains de kafir, mil, maïs et racines de plante munkoyo	Bactéries lactiques, levures	Boisson faiblement alcoolisée	Congo, Zambie

**Tableau II** (suite)

Nom local	Matière première	Microorganismes impliqués	Nature /Utilisation	Pays/Origine
<i>Mutwiwa</i>	Maïs	Bactéries lactiques, moisissures	Bouillie	Zimbabwe
<i>Nasha</i>	Sorgho	<i>Streptococcus, Lactobacillus, Candida, S. cerevisiae</i>	Bouillie	Soudan
<i>Ogi</i>	Maïs, sorgho, mil	<i>Lactobacillus, Lact. plantarum S. cerevisiae, Corynebacterium, Aerobacter, Rhodotorula., Cephalosporium, Fusarium, Aspergillus, Penicillium</i>	Bouillie à base de pâte fermentée utilisée comme petit déjeuner et aliment de sevrage	Nigéria, Afrique de l'Ouest
<i>Pito</i>	Sorgho, maïs	<i>Aspergillus, Penicillium., Rhizopus oryzae, Gibberella, Geotrichum, Lactobacillus. Candida, S. cerevisiae, Lact fermentum, Lact. delbrueckii, Pediococcus spp</i>	Boisson alcoolisée	Nigéria, Ghana
<i>Pozol</i>	Sorgho, maïs	<i>Lactococcus, Streptococcus, Lactobacillus</i>	Pâte fermentée en boules, aliment de base	Mexique
<i>Puto</i>	Maïs	<i>Leuconostoc, Streptomyces, levures</i>	Pâte pour assaisonnement	Philippines
<i>Sake</i>	Riz, sucre	<i>Aspergillus oryzae, bactéries lactiques, Saccharomyces sake</i>	Boisson alcoolisée claire ou « vin » de riz	Japon
<i>Seketeh</i>	Riz	<i>Saccharomyces, Lactobacillus, Lactococcus, Bacillus, Aspergillus, Mucor</i>	Boisson alcoolisée	Nigéria
<i>Takju</i>	Maïs	Bactéries lactiques, <i>S. cerevisiae</i>	Boisson alcoolisée claire	Korée
<i>Talla</i>	Riz, Blé	Bactéries lactiques, levures	Boisson trouble alcoolisée	Ethiopie
<i>Tapai- pulut</i>	Sorgho	<i>Chlamydomucor, Endomycopsis, Hansenula</i>	Boisson alcoolisée épaisse	Malaisie
<i>Tape- ketan</i>	Riz	<i>Saccharomyces, Hansenula, Rhizopus, Chlamydomucor, Mucor, Endomycopsis</i>	Pâte molle alcoolisée, aliment de base	Indonésie
<i>Tapuy</i>	Riz, manioc	<i>Saccharomyces, Mucor, Rhizopus, Aspergillus, Leuconostoc, Lactobacillus</i>	Boisson alcoolisée, sucrée et acidulée	Philippines
<i>Tobwa</i>	Maïs	Bactéries lactiques	Boisson non alcoolisée	Zimbabwe
<i>Torani</i>	Maïs	<i>Hansenula, Candida, Geotrichum</i>	Liquide pour assaisonner les légumes	Inde
<i>Uji</i>	Riz, maïs, sorgho, mil, manioc	<i>Leuconostoc, Lactobacillus</i>	Bouillie, aliment de base	Kenya, Ouganda, Tanganyika
<i>Vada</i>	Maïs, Sorgho, mil, légumes	<i>Pediococcus, Streptococcus, Leuconostoc</i>	Petit déjeuner ou snack	Inde

## I. 2. Les bières traditionnelles Africaines

Il existe une diversité de boissons fermentées préparées à partir de matières premières amylacées ou sucrées comme les céréales (sorgho, mil, maïs, riz, orge, blé), les tubercules (manioc, patate douce), les fruits (ananas, banane, mangue...), la sève de palme, le sucre de canne, le miel etc. Leur mode de préparation et la matière première utilisée varient d'une société à l'autre. Les bières traditionnelles représentent les boissons fermentées à base de céréales les plus populaires en Afrique. Ce sont des bières opaques légèrement alcoolisées, non filtrées et non stabilisées, contenant des substances insolubles, différentes des bières modernes (Rooney et Serna-Saldivar, 1991). Les substances insolubles sont surtout constituées de fragments d'amidon et de dextrines qui n'ont pas été dégradés pendant l'empâtage et la fermentation (Glennie et Wight, 1986). Elles ont un caractère acide, un goût et une couleur caractéristiques, contiennent de fortes proportions d'amidon et de sucres, en plus des protéines, matières grasses, vitamines et sels minéraux (Chitsika et Mudimbu, 1992). La bière opaque est plus un aliment qu'une boisson (FAO, 1995). Ces boissons jouent un rôle socio-culturel important car elles sont omniprésentes lors de différents événements socioculturels tels que les mariages, baptêmes et funérailles (Sanni et Lonner, 1993).

La principale matière première demeure le sorgho qui est utilisé seul ou en association avec le maïs ou le mil. Communément appelées bières de sorgho, bières de mil, bières opaques, bières autochtones ou bières indigènes, ces boissons sont connues sous diverses appellations locales selon les régions et les groupes ethniques: *Keffir beer* ou *Bantu beer* en Afrique du Sud (Novellie, 1968), *pito* au Ghana, Togo et Nigéria (Ekundayo, 1969; Demuyakor et Ohta, 1991; Sefa-Dedeh *et al.*, 1999), *dolo*, *doro* ou *tchapalo* au Burkina Faso, au Mali et en Côte d'Ivoire (Yao *et al.*, 1995; Konlani *et al.*, 1996; Bougouma, 2002), *burukutu* ou *choukoutou* au Bénin, Nord Nigéria et au Ghana (Sanni, 1993; Hounhouigan, 2003), *otika* au Nigéria et au Ghana (Faparusi *et al.*, 1973; Sefa-Dedeh et Asante, 1988; Chinyere et Onyekwere, 1996), *bili-bili* au Tchad et au Nord Cameroun (Nanadoum, 2001, Nso *et al.*, 2003), *merissa* au Soudan (Dirar, 1978), *talla* en Ethiopie (Streinkraus, 2002; Blandino *et al.*, 2003), *munkoyo* au Congo et en Zambie (Herbert, 2003), *chibuku* au Zimbabwe (Togo *et al.*, 2002), *busaa* au Kenya (Nout, 1980).

De toutes ces bières traditionnelles, seule la *Keffir beer* d'Afrique du Sud a fait l'objet d'études poussées et est produite à l'échelle industrielle par les brasseries des municipalités locales et des mines depuis les années 1950. Le procédé de production est basé sur la méthode

traditionnelle de brassage et comprend les opérations suivantes: l'empâtage fait avec de l'eau chaude (45-50°C), l'acidification par fermentation lactique (6-15h) dans des tanks fermés à 45-50°C favorables au développement de souches thermophiles de *Lact. delbrueckii*, la cuisson, la conversion, la filtration et la fermentation alcoolique avec *Saccharomyces cerevisiae* (Schwartz, 1956; Van Der Walt, 1956).

### **I.2.1. La technologie du *dolo* et du *pito***

Le *dolo* et le *pito* sont produits respectivement au Burkina Faso et au Ghana. Au Ghana, la production du *pito*, traditionnellement encrée dans les pratiques des peuples de la région Nord du pays, est de nos jours étendue sur tout le territoire grâce à l'émigration. Il existe 4 types de *pito* selon la méthode d'extraction du moût et la technique de fermentation pratiquée par les groupes ethniques: *Nandom*, *Kokomba*, *Togo* et *Dagarti* (Sefa-Dedeh, 1991; Sefa-Dedeh *et al.*, 1999).

Au Burkina Faso, le *dolo* est produit sur toute l'étendue du territoire et se distingue également selon les groupes ethniques. Ainsi il y a par exemple le *dolo mossi*, *dagara*, *lobi*, *samo*, *bissa*, *bobo*, *turqua*.... La production du *dolo* au Burkina Faso et dans la plupart des pays Africains est une activité principalement féminine génératrice de revenus substantiels qui contribue au développement socio-économique des populations. Les femmes productrices de *dolo* sont appelées dolotières au Burkina Faso et représentent 15% des femmes. Elles possèdent une licence pour la fabrication du *dolo* et tiennent un cabaret ou lieu de vente du *dolo*. Le cycle de production est de 2 ou 3 fois en moyenne par semaine avec 225 à 900 litres de *dolo* par production (Herbert, 2003).

Dans la technologie des bières traditionnelles, les céréales (sorgho, mil, maïs) sont transformées en malt après une germination, puis utilisées pour le brassage (Demuyakor et Okta, 1991). Dans le cas du *dolo* et du *pito*, le sorgho est utilisé comme principale matière première et le procédé traditionnel comprend deux grandes étapes: le maltage des grains de sorgho et le brassage.

#### **I.2.1.1 La matière première : le sorgho**

Le sorgho a été utilisé depuis des siècles pour le brassage des bières traditionnelles en Afrique (Faparusi, 1970; Novellie, 1977) où plus de la moitié de sa production est utilisée pour la fabrication de cette boisson (Rubayiza, 1998). L'introduction du sorgho dans la production industrielle de la bière blonde est par contre récente (Agu et Palmer, 1998).

### **a)Description**

Le sorgho est une plante herbacée annuelle de la tribu des *Andropogoneae*, de la sous-famille des *Panicoideae* et de la famille des *Poaceae*. Il est cultivé soit pour ses grains (sorgho grain), soit comme fourrage (sorgho fourrager). Le sorgho serait originaire d'Afrique, précisément d'Ethiopie il ya environ 5000 à 7000 ans. En 1753 trois espèces de sorgho cultivées (*Holcus sorghum*, *Holcus saccharatus* et *Holcus bicolor*) avaient été décrites par Linné. Puis en 1794, Moench avait distingué le genre *Sorghum* du genre *Holcus*, et en 1805 Person avait suggéré le nom de *Sorghum vulgare* pour *Holcus sorghum* (L.). Le nom *Sorghum bicolor* (L.) Moench qui est actuellement utilisé a été proposé en 1961 par Clayton. Le nom *Sorghum vulgare* Pers est aussi couramment utilisé. De nos jours, le sorgho est connu sous diverses appellations: grand mil et herbe de Guinée en Afrique de l'Ouest, blé *kaffir* en Afrique du Sud, *durra* au Soudan, *mtama* en Afrique Orientale, *jowar* en Inde, *kaoliang* en Chine, *milo* ou *milo-maïs* aux Etats-Unis (Hulse *et al.*, 1980; FAO, 1995).

Le sorgho cultivé présente une diversité morphologique et génétique. Une classification simplifiée définit cinq races principales d'après les caractéristiques de la panicule et de l'épillet (Hulse *et al.*, 1980):

- la race *bicolor* cultivée en Asie et en Afrique,
- la race *guinea*, typique de l'Afrique de l'Ouest, mais qu'on trouve aussi en Afrique Australe et en Inde,
- la race *caudatum*, surtout cultivée en Afrique du Centre et de l'Est,
- la race *kaffir* répandue en Afrique Australe,
- la race *durra*, rencontrée essentiellement en Afrique de l'Est, au Moyen-Orient et en Inde.

L'analyse du polymorphisme enzymatique réalisée sur des cultivars de sorgho traditionnels africains et asiatiques a révélé une diversité organisée autour de trois pôles géographiques. Cette diversité enzymatique qui s'organise sans liaison directe avec la classification raciale, mais en relation étroite avec l'origine géographique des cultivars, a également permis une classification du sorgho en trois groupes : le premier groupe comprend essentiellement les variétés de la race *guinea* d'Afrique de l'Ouest, le deuxième groupe les variétés d'Afrique Australe des cinq races et le troisième groupe, les variétés des races *durra* et *caudatum* d'Afrique Centrale et Orientale (Ollitrault *et al.*, 1989). Au Burkina Faso, on rencontre surtout les races *guinea* et *caudatum* (Trouche *et al.*, 2001).

## ***b) Distribution et production***

Grâce à son système racinaire et sa physiologie, le sorgho résiste et s'adapte bien à la chaleur, à la sécheresse et aux sols peu fertiles. De nos jours, le sorgho est répandu dans les zones tropicales arides et semi-arides d'Afrique, d'Amérique, d'Asie et d'Australie à cause de sa tolérance à la sécheresse (Doggett, 1988). Il est cultivé dans toutes les zones agro-écologiques du Burkina Faso, depuis le Nord au climat sahélien jusqu'à l'extrême Sud-Ouest au climat nord-guinéen, sa zone de prédilection étant la zone nord-soudanienne (Trouche *et al.*, 2001).

La production mondiale annuelle est estimée à 65 millions de tonnes et le sorgho est classé cinquième céréale mondiale après le blé, le riz, le maïs et l'orge. Il occupe la deuxième position après le maïs en Afrique où sa production atteint 16 millions de tonnes, et sa culture couvre environ 51% des superficies destinées aux cultures céréalières. Au Burkina Faso, la production annuelle est estimée à 1,6 millions de tonnes, soit plus de la moitié de la production céréalière et le pays est classé dixième producteur mondial, et troisième producteur d'Afrique après le Nigéria et le Soudan (FAO, 2005).

## ***c) Structure et constitution du grain de sorgho***

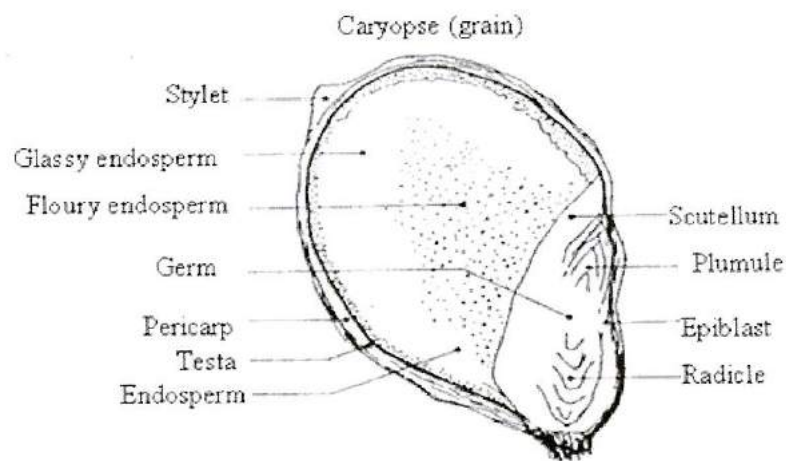
Le grain de sorgho est un caryopse partiellement couvert de glumes, constitué du péricarpe, de l'endosperme ou albumen et du germe ou embryon (Fig. 1); le péricarpe, l'endosperme et le germe représentent respectivement 4-9%, 81-86% et 7-12% du poids du grain (Hulse *et al.*, 1980; Serna-Saldivar et Rooney, 1995). La couleur du grain varie de blanc ou jaune pâle à brun-rouge foncé, en passant par différentes tonalités de rouge et de brun.

Le péricarpe est un ensemble de tissus (épicarpe, mésocarpe et endocarpe) qui recouvre le grain. En dessous de l'endocarpe, il y a le testa ou enveloppe de la graine qui est pigmentée et renferme des tannins. La présence de pigment et la couleur représentent un caractère génétique. Dans certains génotypes, le testa est partiel ou absent. Le grain de sorgho qui possède un testa contient du tannin en proportions diverses selon la variété.

L'albumen a une fonction de réserve et constitue la majeure partie du grain; il comprend:

- la couche à aleurone, riche en protéines, sels minéraux, vitamines hydrosolubles et enzymes autolytiques,
- l'albumen périphérique, riche en protéines et sels minéraux,
- l'albumen vitreux ou corné, riche en amidon,
- et l'albumen farineux, essentiellement riche en amidon.

Le germe renferme l'embryon et le scutellum. L'embryon est composé de la gemmule et la radicule qui vont engendrer respectivement la tige et la racine pendant la germination. Le scutellum est un tissu de réserve riche en nutriments (lipides, protéines, enzymes, sels minéraux et vitamines) qui protège le germe et joue un rôle déterminant dans la mobilisation et le transfert des réserves de l'albumen à la plantule pendant la germination.



**Figure 1:** Structure du grain de sorgho d'après Sautier et O'Deye (1989) (Source: Dicko, 2005)

#### ***d) Composition du grain de sorgho***

Comme le montre le Tableau III, le grain de sorgho a une composition très variable, due aux facteurs génétiques et environnementaux, aux pratiques agronomiques et aux conditions écologiques (Hulse *et al.*, 1980; Jambunathan et Subramanian, 1988; Rooney et Serna-Saldivar, 1991).

L'amidon est constitué d'amylopectine (70 à 80%) et d'amylose (20 à 30%). Les fibres brutes ou polysaccharides non assimilables sont essentiellement constituées d'arabinoxylanes et d'autres types de glucanes tels que les  $\beta$ -glucanes qui sont solubles dans l'eau et forment des solutions visqueuses et collantes (Hatfield *et al.*, 1999).

Les protéines constituent la deuxième composante principale du grain dont la teneur est à la fois influencée par les facteurs génétiques et environnementaux. La lysine est l'acide aminé le plus limitant des protéines du sorgho. Quant à la matière grasse, elle est constituée pour ce qui



concerne les acides gras, principalement d'acide linoléique (49 %), d'acide oléique (31%), d'acide palmitique (14%), d'acide linoléique (2,7 %) et d'acide stéarique (2,1 %) (Rooney, 1978).

Le phosphore, le magnésium, le calcium, le fer, le zinc et le cuivre constituent les principaux éléments minéraux du grain de sorgho. Le sorgho est également considéré comme une source de vitamines du groupe B comme la thiamine ou vitamine B1, la riboflavine ou vitamine B2, la niacine ou acide nicotinique et la pyridoxine ou vitamine B6. Des quantités détectables de vitamines liposolubles (D, E, K) ont été trouvées dans le grain de sorgho (Hulse *et al.*, 1980; FAO, 1995).

Le grain de sorgho contient des inhibiteurs nutritionnels et des substances toxiques comme par exemple la durrhine, des phytates et des composés phénoliques qui interfèrent avec la digestion, l'absorption ou d'autres aspects du métabolisme des nutriments. Les phytates ont une forte capacité à complexer les protéines et les cations multivalents, réduisant ainsi la biodisponibilité des substances complexées. Doherty *et al.*(1982) ont par exemple rapporté que plus de 85 % du phosphore total du grain de sorgho entier sont constitués de phosphore phytique. Les grains de sorgho rouge ont une forte concentration en phytates (Traoré *et al.*, 2004). Le sorgho contient des teneurs élevées en composés phénoliques pouvant atteindre des taux de 6% ms (Rooney et Waniska, 2004). Ces substances phénoliques comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes et les polyphénols condensés comme les tannins. Ces derniers composés bien que naturellement impliqués dans le mécanisme de résistance et de défense de la plante contre le stress, les prédateurs, les pathogènes, la sécheresse (Parr and Bolwell, 2000), sont dans la plupart des cas indésirables sur le plan alimentaire (Reed, 1995). Certaines substances phénoliques peuvent être éliminées par des traitements technologiques comme la cuisson (Gaitan *et al.*, 1989). Les tannins condensés ont un goût amer et astringent et ont la capacité de complexer les protéines, les hydrates de carbones et les minéraux, ce qui affecte le statut nutritionnel et fonctionnel, et la digestibilité des nutriments complexés (Salunkhe *et al.* 1990). La plupart des variétés de *Sorghum bicolor* cultivées au Burkina Faso ont une teneur en tannins inférieure à 0,25%; les variétés de sorgho rouge utilisées pour la production du *dolo* au Burkina présentent les plus fortes teneurs en composés phénoliques et en polyphénoloxydases (Dicko *et al.*, 2002).

**Tableau III:** Composition en nutriments du grain de sorgho (Sources: Hulse *et al.*, 1980; FAO, 1995; FAO, 1999; Dicko, 2005)

Macronutriments (g pour 100g)		Micronutriments					
		Eléments minéraux (mg/100g ms)		Vitamines (mg/100g ms)		Acides aminés essentiels (mg/g)	
Glucides totaux	65-90	P	167-756	Niacine	2,9 - 6,4	Leu	832
Sucres solubles	1,3-5,2	Mg	140-171	Pyridoxine	0,5	Ile	245
Saccharose	0,9 - 3,9	Ca	11-586	Thiamine	0,24 - 0,54	Met	87
Glucose & fructose	0,06 - 0,74	Fe	0,9-20,0	Acide pantothénique	1,25	Cys	94
Raffinose	0,10 - 0,23	Zn	2,5	Riboflavine	0,1 - 0,2	Lys	126
Stachyose	0,04 - 0,21	Cu	0,44-1,8	Biotine	0,042	Phe	306
Amidon	55,6-75,2	Mn	1,15	Folacine	0,02	Tyr	167
Amylose	21,2-30,2	Na	19			Thr	189
Amylopectine	45-55	Cl	57			Trp	63
Fibres brutes	1,0 - 3,4	K	220			Val	313
Protéines	4,4 -16,6						
Matières grasses	2.1-7,6						
Cendres brutes	1,2-3,5						
Humidité	8-12						
Energie (Kcal)	329						

### I.2.1.2 Le maltage et son impact sur le grain de sorgho

Le maltage est un procédé utilisé pour la production de malts de céréales destinés à la fabrication de boissons alcoolisées. Le maltage traditionnel du sorgho comprend les opérations de trempage des grains, de germination et de séchage solaire des grains germés (Sefa-Dedeh, 1991; Yao *et al.*, 1995; Traoré *et al.*, 2004). Selon Dewar et ses collaborateurs (1997) les objectifs visés à travers le maltage sont :

-la production d'enzymes hydrolytiques principalement amylases, maltases, dextrinases, glucanases, protéases et peptidases,

- la production de sucres fermentescibles à partir de polymères glucidiques contenus dans le grain,
- la solubilisation de substances métaboliques (acides aminés, peptides, sucres, vitamines...),
- la fragilisation de l'endosperme des cellules et le développement de caractéristiques organoleptiques du malt.

Les caractéristiques organoleptiques concernent la couleur, les arômes, le goût sucré et la friabilité du malt. Toutes ces transformations sont réalisées grâce au trempage et la germination des grains, et se poursuivent jusqu'au séchage qui arrête certaines activités enzymatiques et stabilise les grains germés (Galzy et Moulin, 1991). Ces modifications biochimiques et organoleptiques sont essentielles pour la qualité du malt et celle des produits dérivés comme les bières.

Le maltage du grain de sorgho active et génère des enzymes hydrolytiques dont les principaux sont l' $\alpha$ -amylase, la  $\beta$ -amylase, l' $\alpha$ -glucosidase et des protéases (Taylor et Robins, 1993; Taylor et Dewar, 1994; Traoré *et al.*, 2004). Demuyakor et Ohta (1992) ont montré que le maltose, le glucose et les dextrans sont les principaux sucres issus de l'hydrolyse de l'amidon pendant la germination de variétés de sorgho du Ghana, alors que le triose, le raffinose et le xylose apparaissent en faibles quantités. Traoré *et al.* (2004) ont par ailleurs mis en évidence des teneurs appréciables en fructose, glucose et saccharose dans le malt de sorgho. La qualité du malt se définit par son pouvoir diastasique c'est-à-dire sa capacité à hydrolyser l'amidon donc sa richesse en amylases solubles. La qualité du malt de sorgho dépend de certains paramètres tels que la température et la durée de stockage des grains, la durée de trempage, la température et la durée de germination, la température de séchage (Demuyakor et Ohta, 1992; Owuama et Asheno, 1994; Agu et Palmer, 1998) ; la qualité du malt est également fonction de la variété de sorgho utilisé (Demuyakor et Ohta, 1992; Subramanian *et al.*, 1995). Ainsi, des conditions optimales de maltage du sorgho ont été définies pour l'obtention d'un malt de qualité, dont un trempage jusqu'à une hydratation maximum de 33-36%, une germination à 25-30°C pendant 3 à 5 jours (Demuyakor et Ohta, 1992; Agu et Palmer, 1998) et une température de séchage du malt vert inférieure à 65°C.

Les enzymes générées pendant le maltage sont indispensables aux opérations de brassage pour l'obtention d'un moût riche en matières solubles (sucres, acides aminés, peptides, ...) favorable au développement des bactéries lactiques et levures. Les conditions de trempage et de germination favorisent le développement de la flore originelle des grains dont la charge se réduit généralement lors du séchage. Le développement de moisissures toxigènes et de bactéries indésirables à la surface des grains lors de la germination, peut avoir des effets néfastes sur la

qualité du malt et des produits finis, et présenter des risques pour la santé du consommateur (Flannigan *et al.*, 1982; Galzy et Moulin, 1991). Ilori et collaborateurs (1991) puis Ogundiwin et collaborateurs (1991) ont par exemple identifié dans le grain et le malt de sorgho, diverses bactéries et moisissures dont *Bacillus cereus*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina* spp., *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium* spp. *Penicillium* spp. La germination a une grande incidence sur la composition du grain de sorgho. Elle permet de réduire la concentration de facteurs antinutritionnels dans les grains germés et d'améliorer la biodisponibilité de certains minéraux et la qualité nutritionnelle (Svanberg et Sandberg, 1989; Marero *et al.*, 1991; Mbofung and Fombang, 2003). Une réduction des phytates et des tannins est généralement observée durant le maltage des grains de sorgho et le taux de réduction est fonction des durées et des températures de trempage et de germination (Mahgoug et Elhag, 1998; Svanberg et Sandberg, 1989; Mbofung et Fombang, 2003; Traoré *et al.*, 2004). Wang et Fields (1978) ont par ailleurs constaté une augmentation substantielle des teneurs en lysine, méthionine et tryptophane pendant la germination du grain de sorgho. Le sorgho n'est pas une source de vitamine C; toutefois, la germination favorise la synthèse d'une certaine quantité de vitamine C dont la teneur augmente pendant la fermentation (Taur *et al.*, 1984). Cependant, la germination favorise la formation d'une toxine, le cyanure : pendant la germination, la durrhine, un glucoside cyanogène, engendre la formation de cyanure avec de fortes concentrations dans les jeunes pousses et les radicules du sorgho germé (Panasiuk et Bills, 1984; Aniche, 1990; Ahmed *et al.*, 1996; Uvere *et al.*, 2000). Pour cela, les jeunes pousses et radicules du sorgho germé et leurs extraits ne doivent jamais être consommés par des personnes ou des animaux, si ce n'est en quantité minimale (FAO, 1995). Dada et Dendy (1988) ont par ailleurs montré que l'élimination des pousses et des radicules et la transformation ultérieure réduisaient la teneur en acide cyanhydrique de plus de 90 %. Le malt de sorgho entre également dans la formulation de farines infantiles dans l'objectif d'accroître la valeur énergétique des bouillies par l'action de l'alpha amylase, une enzyme liquéfiante (Malleshi *et al.*, 1989; Traoré *et al.*, 2004). Le malt de sorgho est traditionnellement utilisé dans plusieurs pays d'Afrique, mais toujours après élimination des parties toxiques. Au cours du maltage traditionnel du sorgho, les malteuses procèdent à un polissage partiel du malt séché en éliminant une partie des radicules et tigelles. De même, au cours du brassage du *dolo*, radicules et tigelles sont également partiellement éliminées pendant l'empâtage. Selon les productrices, cette élimination vise à réduire l'amertume et l'astringence dans le *dolo*.

### **I.2.1.3 Le brassage traditionnel du *dolo* et du *pito***

Peu d'études ont été réalisées sur les aspects technologiques, biochimiques et microbiologiques liés au brassage traditionnel du *dolo* et du *pito*. Les travaux existants se sont limités à une description du processus de fabrication du *dolo* ou du *pito*, qui comprend généralement le broyage/concassage du malt de sorgho, l'empâtage, la saccharification, la filtration, la cuisson, le refroidissement et la fermentation alcoolique du moût refroidi (Bougouma, 1981; Sefa-Dedeh, 1991; Yao *et al.*, 1995; Sefa-Dedeh *et al.*, 1999; Mandjeka, 2002). De ces travaux, la phase d'acidification n'était presque pas perçue et décrite bien qu'une baisse de pH était observée pendant la saccharification décrite comme une hydrolyse de l'amidon par les amylases endogènes du malt de sorgho. Par analogie au brassage de la bière moderne, le principe de l'empâtage est basé sur l'infusion et/ou la décoction afin d'extraire un moût fermentescible par la solubilisation dans l'eau des substances solubles et l'hydrolyse enzymatique de l'amidon et d'autres macromolécules. Le moût extrait du malt de sorgho a une concentration similaire en glucose et en maltose (Taylor, 1992; Byrne *et al.*, 1993). Des extraits de plantes mucilagineuses sont utilisés comme agents de floculation pour favoriser la décantation pendant l'empâtage et la clarification du moût. Les plantes généralement utilisées sont *Grewia bicolor* Juss, *Abelmoschus esculentus* (L) Moench, *Adansonia digitata*, *Bombax costatum*, Pellegr et Vuillet., *Bridelia micrantha*, *Ceratotherca cesamoïdes* (Sefa-Dedeh, 1991; Nacoulma, 1996; Nanadoum, 2001; Bougouma, 2002).

### **I.3 Impact de la fermentation lactique sur la qualité des produits céréaliers**

De manière générale, la fermentation joue au moins cinq rôles (Steinkraus, 1995; Simango, 1997; Steinkraus, 2002; Holzapfel, 2002) dans le domaine alimentaire qui sont :

- l'amélioration de l'alimentation humaine à travers le développement d'une diversité de saveurs, d'arômes et de textures des aliments;
- la conservation / transformation des aliments et l'amélioration de leur salubrité à travers les effets bénéfiques des fermentations de types lactique, alcoolique, acétique et alcaline;
- l'enrichissement par voie biologique des aliments en vitamines, protéines, acides aminés essentiels et acides gras essentiels;
- l'amélioration de la qualité nutritionnelle et la détoxification des aliments par la réduction de facteurs antinutritionnels (tannins, phytates, polyphénols ...), la dégradation ou l'inactivation de toxines naturelles notamment les glucosides cyanogéniques du manioc (Padmaja *et al.*, 1993;

Kimaryo *et al.*, 2000) et certaines mycotoxines notamment la toxine d'*Alternaria* et la patuline (Holzapfel, 1997)

- la réduction de la durée de cuisson des aliments et par conséquent la réduction de l'énergie nécessaire.

La fermentation lactique est largement utilisée dans les régions tropicales comme la méthode la plus économique pour transformer / conserver les denrées alimentaires (Cooke *et al.*, 1987; Nout et Motarjemi, 1997) ; elle contribue efficacement à la salubrité, l'amélioration des propriétés nutritionnelles et organoleptiques, la prolongation de la durée de conservation et l'acceptabilité des produits céréaliers (Oyewole, 1997; Mattila-Sandholm, 1998). La fermentation lactique permet de réduire la teneur en polysaccharides non digestes, favorise la synthèse d'acides aminés et améliore la disponibilité des vitamines du groupe B (Holzapfel, 2002). Odunfa et Adeyele (1987) ont par exemple montré que la fermentation du sorgho diminuait la concentration en sucres flatulents comme le raffinose et le stachyose, qui provoquent des indigestions et des diarrhées chez l'homme. Ces sucres comportent des liaisons  $\alpha$ -D-galactosidiques résistantes à la cuisson et à certains traitements technologiques artisanaux, mais peuvent être hydrolysées par des  $\alpha$ -galactosidases produites par certaines moisissures et bactéries associées à l'appareil digestif et aux produits fermentés (Holzapfel, 2002). La production d' $\alpha$ -galactosidases par les bactéries lactiques est variable pour certaines espèces, mais apparaît comme une propriété courante chez *Lactobacillus fermentum*, *Lact. brevis*, *Lact. buchneri*, *Lact. cellobiosus* et *Lact. salivarius* (Mital *et al.*, 1973) et peut être induite chez *Lact. plantarum* (Ahmé and Molin, 1991).

La fermentation lactique du sorgho améliore sa digestibilité et sa valeur nutritive par l'augmentation des teneurs en vitamines et en acides aminés notamment la méthionine et la lysine, et par l'inactivation des inhibiteurs nutritionnels (Hamad et Fieds, 1979; Axtell *et al.*, 1981; Kazanas et Fields, 1981; Au et Fields, 1981; Eggum *et al.*, 1983 ; Graham *et al.*, 1986). La fermentation lactique crée des conditions optimum de pH, favorables à la dégradation enzymatique des phytates complexant des cations polyvalents (fer, zinc, calcium, magnésium) et les protéines; cette dégradation augmente considérablement la biodisponibilité de ces minéraux (Chavan et Kadam, 1989; Haard *et al.*, 1999). La bière traditionnelle *amgba* et le vin *affouk*, boissons fermentées à base de sorgho du Cameroun, sont au plan nutritionnel, supérieures à la farine de sorgho, car elles apportent un supplément de riboflavine, de thiamine et de lysine. La bière traditionnelle de sorgho est source de vitamines du groupe B, d'éléments minéraux (cuivre,

fer, manganèse, magnésium, phosphore, calcium), d'amidon (26,7 g/l), de protéines (5,9 g/l); en outre, l'absorption du fer à partir de la bière de sorgho est 12 fois plus élevée qu'à partir du sorgho (FAO, 1995). Durant la fermentation de la bière traditionnelle du peuple Bantou ou *Kaffir beer*, produite à partir du malt de grains de *kaffir* (*Sorghum caffrorum*), de mil ou de maïs, la teneur en thiamine reste constante; par contre, les teneurs en riboflavine et en niacine sont au moins doublées (Steinkraus, 2002). La fermentation permet également de réduire le taux de cyanure dans les pousses de sorgho germé (Orizoba et Atii, 1991), et inhibe la liaison des protéines par les polyphénols (Bach Knudsen *et al.*, 1988). En outre, durant la fermentation des céréales, divers composés volatils sont formés et contribuent favorablement à renforcer la flaveur des produits (Halm *et al.*, 1993; Annan *et al.*, 2003 ).

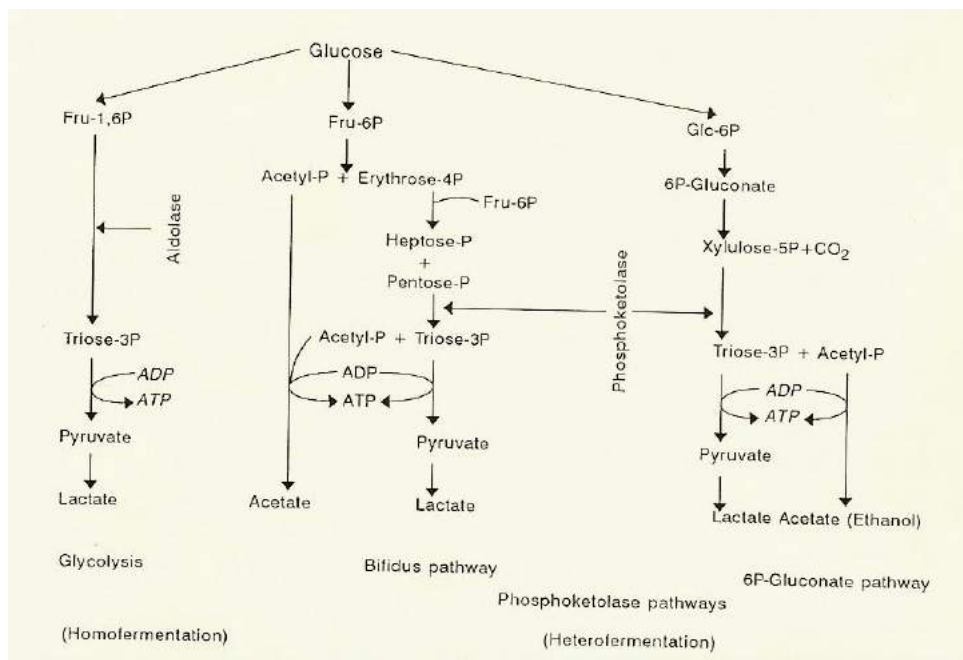
Ainsi, la valeur nutritionnelle du produit obtenu par fermentation lactique peut être améliorée par la destruction de substances toxiques ou indigestes, par l'apparition de facteurs de croissance d'origine microbienne (vitamines, acides aminés), ou de manière plus générale par une importante modification de la composition, de la texture et des propriétés organoleptiques.

## **I. 4. Les bactéries lactiques**

### **I.4.1 Généralités**

Les bactéries lactiques ont très tôt retenu l'attention des scientifiques, en témoignent les travaux de Pasteur sur la fermentation lactique en 1857, puis l'identification et la description de la première espèce bactérienne, *Bacterium lactis* (*Lactococcus lactis* de nos jours) par Lister en 1873. Les premiers critères de définition des bactéries lactiques étaient basés sur leur capacité à fermenter et à coaguler le lait, ce qui incluait les coliformes dans ce groupe. Puis, la description des *Lactobacillus* par Beijerinck en 1901 comme des bactéries Gram-positif, a permis d'exclure les coliformes du groupe des bactéries lactiques. Orla-Jensen en 1919 définissait les « vraies bactéries lactiques » comme des bactéries Gram-positif, immobiles, non sporulantes, oxydase-négative, catalase-négative pour la plupart et ayant la capacité de fermenter les hydrates de carbone en produisant de l'acide lactique. Deux voies fermentaires existent chez les bactéries lactiques (Fig.2): la fermentation est homolactique si l'acide lactique est produit à plus de 85%; elle est hétérolactique si en plus de l'acide lactique, le dioxyde de carbone, l'éthanol et/ou l'acide acétique sont formés en quantité équimolaire. Selon le mode de fermentation obligatoire ou préférentiel, les bactéries sont dites homofermentaires ou hétérofermentaires obligatoires ou facultatives. En effet, certaines bactéries homofermentaires sont capables de réaliser la

fermentation hétérolactique dans des conditions de croissance non optimales ou selon la nature du sucre. Les bactéries lactiques ont une faible capacité de biosynthèse, d'où leur polyauxotrophie pour divers acides aminés, bases nucléiques, vitamines et acides gras, et également leur métabolisme fermentaire. La relation des bactéries lactiques avec l'oxygène est complexe; elles sont normalement dépourvues de cytochromes et en conséquence elles sont inaptes à toute respiration aérobie ou anaérobie, d'où leur métabolisme fermentaire. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives, microaérophiles, capables de fermentation en anaérobiose comme en aérobie (Novel, 1993; Holzapfel et Wood, 1995; Klein *et al.*, 1998).



**Figure 2 :** Représentation schématisée des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (Source: Wood et Holzapfel, 1995)

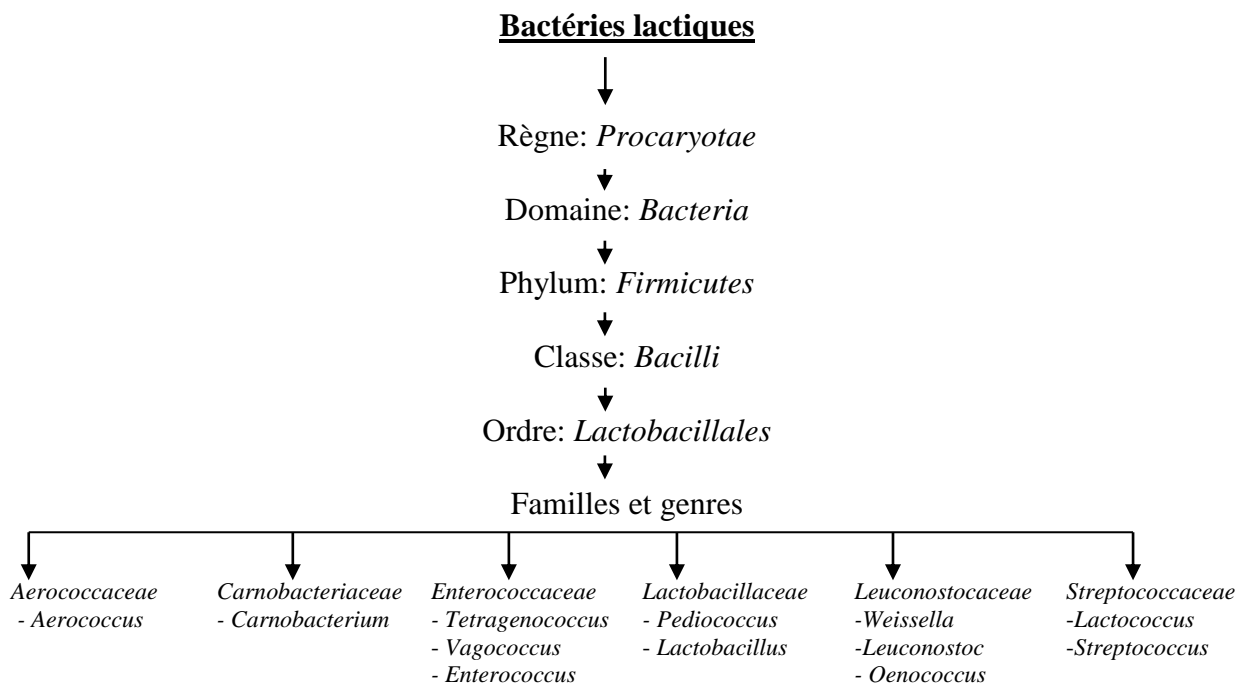
### 1.4.2 Habitat

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquistes et peuvent être isolées de divers substrats et environnements. Leurs principaux habitats sont: les produits alimentaires fermentés ou non comme les laits et produits laitiers, les grains, les fruits, les légumes, les boissons (jus de fruit, bières, cidres, vins ...), les produits de panification, les viandes, les poissons, les plantes, les fourrages et ensilages, les eaux usées, les sols, mais également le tractus génital, digestif et respiratoire de l'homme et des animaux (Hammes *et al.*, 1992; Novel, 1993).



### I.4.3 Taxonomie et classification des principaux genres de bactéries lactiques

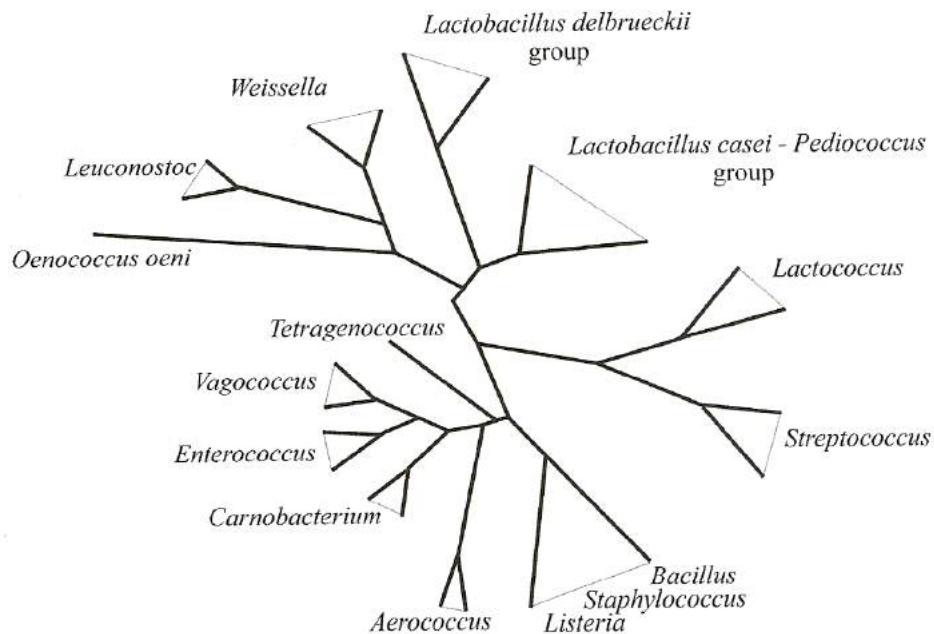
Les bactéries lactiques sont des organismes procaryotes, de la classe des *Bacilli* et de l'ordre des *Lactobacillales* réunissant 6 familles qui sont: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae* (Fig.3). Sur le plan phylogénique, les bactéries lactiques appartiennent à la branche « *Clostridium* » des bactéries Gram-positif, qui se caractérise par un G+C de l'ADN inférieur à 50 moles %.



**Figure 3:** Classification simplifiée des bactéries lactiques associées aux produits alimentaires (Vandamme *et al.*, 1996; Stiles et Holzapfel, 1997; Axelsson, 2004 )

De nos jours, les bactéries lactiques sont définies comme des cocci, coccobacilles ou bacilles, Gram-positif, non sporulantes, généralement catalase-négative (certaines souches produisant de la pseudocatalase dans des milieux de faibles concentrations en sucre), dont le contenu en G+C de l'ADN est généralement inférieur à 50 moles %, bien que certaines espèces de *Lactobacillus* ont un G+C atteignant 55 moles %. Elles comprennent 20 genres, parmi lesquels *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Fig. 3) sont considérés comme les principaux associés aux produits alimentaires (Vandamme *et al.*, 1996 ; Stiles et Holzapfel, 1997; Axelsson, 2004). La Figure 4 présente la phylogénie des

bactéries lactiques sur la base de l'analyse de séquence de l'ADN. Le Tableau IV résume quelques caractéristiques phénotypiques des principaux genres. Le genre *Bifidobacterium*, à cause de son rôle probiotique et de son utilisation en industrie alimentaire, est souvent cité parmi les bactéries lactiques, bien que sur le plan phylogénique il appartient à la branche « Actinomycètes » des bactéries Gram-positif (Vandamme *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 1998).



**Figure 4:** Arbre phylogénétique des bactéries lactiques sur la base de l'analyse de séquence de l'ADN; certaines bactéries aérobies et anaérobies facultatives de la branche « *Clostridium* » des bactéries Gram-positif sont représentées en guise de comparaison (Source: Axelsson, 2004).

#### I.4.3.1 Le genre *Lactobacillus*

Ce genre a été proposé par Beijerinck en 1901 (Kandler et Weiss, 1986b) et comprend de nos jours plus de 110 espèces reconnues (Euzéby, 2004). Les cellules sont polymorphes (bâtonnets, quelquefois courbes à coccobacilles, souvent corynéformes) isolées, en paires et en chaînes. Les lactobacilles ont une forte exigence en facteurs de croissance à savoir acides aminés, vitamines, peptides, sels, acides gras ou esters d'acides gras, dérivés d'acides nucléiques, sucres fermentescibles. Leur croissance est mésophile (30-40°C) avec un pH optimum de 5,5 à 6,2.

Les *Lactobacillus* ont la capacité de fermenter le glucose et différents hydrates de carbone mais les produits de fin de fermentation dépendent de la voie fermentaire de l'espèce

(Fig.5). L'acide lactique est prédominant, cependant dans certaines conditions, l'acétate, l'éthanol, le succinate ou le CO<sub>2</sub> peuvent être formés (Hammes *et al.*, 1992; Klein *et al.*, 1998).

Les lactobacilles avaient été classés en trois sous-groupes fermentaires selon Orla-Jensen (1919) qui sont : *Thermobacterium* (homofermentaires et thermophiles), *Streptobacterium* (homofermentaires et mésophiles) et *Betabacterium* (hétérofermentaires, soit mésophiles, soit thermophiles). Puis, la recherche de la présence ou non de la fructose-1,6-bisphosphate aldolase a permis de répartir les espèces en trois sous-groupes physiologiques: les homofermentaires obligatoires, les hétérofermentaires facultatifs, et les hétérofermentaires obligatoires qui manquent de fructose-1,6-bisphosphate aldolase (Vandamme *et al.*, 1996). Cette subdivision des lactobacilles en groupes fermentaires est toujours utilisée.

Une des caractéristiques des espèces du genre *Lactobacillus* est leur hétérogénéité génétique, avec un contenu G+C de l'ADN variant de 32 à 55 moles % (Kandler et Weiss, 1986a). Cette diversité génétique montre que le genre n'est pas bien défini (Vandamme *et al.*, 1996), en témoigne le transfert de certaines espèces dans des genres nouvellement créés tels que *Carnobacterium* (Collins *et al.*, 1987), *Atopobium* (Collins et Wallbanks, 1992), *Weissella* (Collins *et al.*, 1993) et *Paralactobacillus* (Leisner *et al.*, 2000). Sur le plan phylogénique, les lactobacilles peuvent être subdivisés en trois groupes (Fig. 4): le groupe *Lactobacillus delbrueckii*, le groupe *Lactobacillus casei-Pediococcus* et le groupe *Leuconostoc* (Collins *et al.*, 1991). Les pourcentages d'homologie de l'ARNr 16S varient de 90,8 à 99,3% pour les espèces du groupe *Lactobacillus delbrueckii* et de 90,3 à 99,0 % pour celles du groupe *Lactobacillus casei-Pediococcus* (Collins *et al.*, 1991).

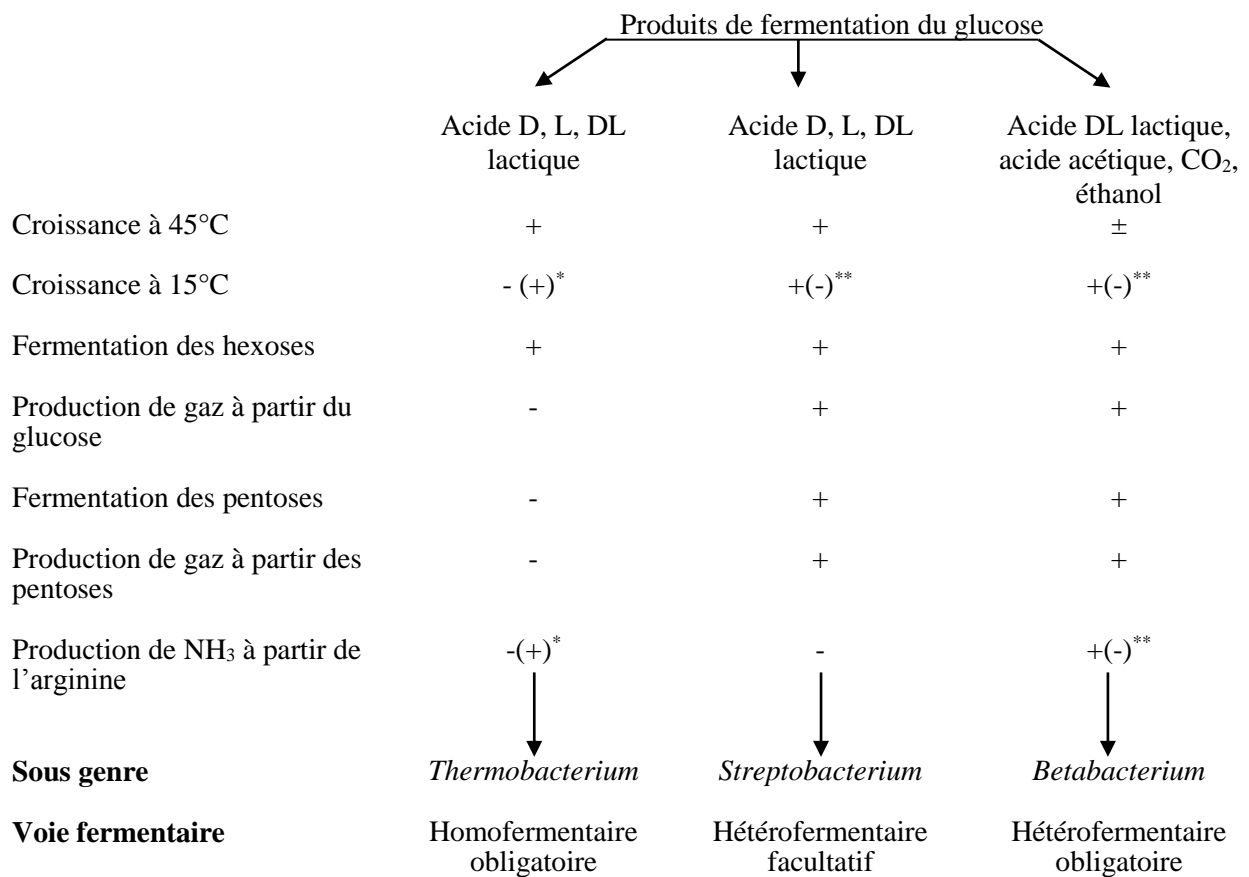
En considérant le type de peptidoglycane (PTG), les propriétés de la lactate déshydrogénase (LDH), l'isomère optique de l'acide lactique produit (Bottazzi, 1988) et l'hybridation ADN-ADN (Sriranganathan *et al.*, 1985), les groupes fermentaires ont été redéfinis par Hammes *et al.* (1992); puis pour intégrer les nouvelles espèces et les données phylogéniques obtenues à partir du séquençage des ARNr, Hammes et Vogel (1995) ont proposé les trois subdivisions suivantes:

-Les lactobacilles homofermentaires obligatoires (groupe A): ce groupe comprend les espèces du groupe *Thermobacterium* et d'autres espèces nouvellement décrites. Les cellules sont longues, droites souvent en palissades. Elles possèdent la fructose-1,6-bisphosphate aldolase mais manquent de phosphocetolase et fermentent de ce fait les hexoses presque exclusivement en acide lactique par la voie d'Embden-Meyerhof (Fig. 2 ; Fig. 5), mais ne fermentent pas les pentoses ou le gluconate. Sur le plan phylogénique, on distingue deux sous-groupes: les espèces

appartenant au sous-groupe de *Lact. delbrueckii* (group Aa) et celles appartenant au sous-groupe de *Lact. Casei-Pediococcus* (groupe Ab). De nombreuses espèces de *Lactobacillus* homofermentaires obligatoires ont une grande importance dans les industries alimentaires et pharmaceutiques où elles sont utilisées comme cultures starter ou comme probiotiques (Holzapfel *et al.*, 1998; Klein *et al.*,1998). *Lact. delbrueckii* et *Lact. acidophilus* sont deux exemples d'espèces appartenant à ce groupe.

-Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (groupe B): ce groupe est formé des espèces du groupe Streptobacterium et de nouvelles espèces. Leurs cellules sont courtes souvent en chaînes. Les espèces fermentent les hexoses presque exclusivement en acide lactique par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas ou glycolyse (Fig.2 ; Fig.5); dans certains cas notamment dans les milieux de concentration limitée en glucose, en plus de l'acide lactique, d'autres métabolites (acide acétique, éthanol ou acide formique) peuvent être produits. D'après Kandler et Weiss (1986b), les espèces possèdent à la fois les aldolases et des phosphocetolases, ce qui fait qu'en plus des hexoses, les pentoses et souvent le gluconate sont également fermentés par voie hétérofermentaire avec production d'acide lactique et d'acide acétique. Sur le plan phylogénique, on distingue les espèces hétérofermentaires du sous-groupe *Lact. delbrueckii* (groupe Ba) et celles du sous-groupe *Lact. casei-Pediococcus* (groupe Bb). *Lact. plantarum* et *Lact. casei* sont deux exemples d'espèces de ce groupe.

-Les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires (groupe C) qui regroupent les Betabacterium et des espèces nouvellement décrites. Les cellules sont courtes, droites, isolées ou en courtes chaînes. Les espèces manquent d'aldolases mais possèdent des phosphocetolases inducibles par les pentoses. Les hexoses sont fermentés par la voie des phosphogluconates avec production d'acide lactique, d'acide acétique, d'éthanol et de CO<sub>2</sub> (Fig.2 ; Fig.5). La fermentation des pentoses produit de l'acide lactique et de l'acide acétique (Kandler et Weiss, 1986b). Au plan phylogénique, on distingue les espèces appartenant au sous-groupe *Lact. casei-Pediococcus* (groupe Cb) et celles appartenant au sous-groupe *Leuconostoc* (groupe Cc), desquelles cinq espèces ont été transférées dans le genre *Weissella* (Collins *et al.*, 1993). *Lact. fermentum* et *Lact. brevis* sont deux exemples d'espèces de ce groupe. De nombreuses espèces de *Lactobacillus* hétérofermentaires sont impliquées dans la fermentation de produits alimentaires d'Afrique et d'ailleurs (Rodas *et al.* 2005, Ehrmann et Vogel, 2005).



\* : négatif dans la plupart des cas, avec quelques exceptions ; \*\* : positif dans la plupart des cas, avec quelques exceptions

**Figure 5:** Différenciation entre les *Lactobacillus* d'après Botazzy (1983) modifiée par Songisepp (2005).

#### I.4.3.2 Le genre *Pediococcus*

Les pédiocoques ont été parmi les premières bactéries étudiées par Pasteur à cause de leur implication dans l'altération des bières. Les cellules sont des coques groupées en paires ou en tétrades. Elles étaient les seules bactéries qui se divisaient en deux plans pour former des tétrades ou paires. Mais les modifications et l'évolution taxonomique ont augmenté le nombre de genres formant des tétrades à trois ; ainsi, les pédiocoques se confondent presque aux microcoques à cause des similarités morphologiques, de la production de la pseudocatalase et de la tolérance au NaCl, et également aux aérocoques (Stiles et Holzappel, 1997). Les pédiocoques sont anaérobies aéro-tolérantes, généralement catalase-négative (certaines souches produisent de la pseudocatalase). Elles sont homofermentaires et fermentent le glucose en produisant du DL ou L(+) lactate par la voie d'Embden-Meyerhof dans les conditions optimales. Leur exigence

nutritionnelle, leur faible activité protéolytique et, chez la plupart des espèces, leur incapacité à utiliser le lactose, ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait (Garvie, 1986b). Le G+C de leur ADN varie de 34 à 44 moles %. Les espèces se différencient généralement par leur tolérance à la température, au pH et au NaCl et par leur spectre fermentaire. *Ped. acidilactici* par exemple est thermotolérant et peut se développer à des températures de l'ordre de 50°C. *Ped. acidilactici* et *Ped. pentosaceus* sont deux espèces très proches qui ne peuvent pas être différenciées par les caractéristiques phénotypiques, mais peuvent l'être par l'homologie ADN-ADN (Garvie, 1986b). Les espèces sont généralement associées aux produits végétaux fermentés ou non, aux produits protéagineux comme les viandes et poissons et à l'environnement des brasseries (Weiss, 1992).

#### **I.4.3.3 Le genre *Streptococcus***

La classification et la nomenclature des *Streptococcus* ont provoqué de nombreuses confusions. Ce sont des bactéries sphériques ou ovoïdes, en paires ou en chaînes, anaérobies facultatives et homofermentaires. De nombreuses espèces sont parasites de l'homme et des animaux et certaines sont pathogènes. Les streptocoques étaient à l'origine classés et décrits sur la base des caractéristiques morphologiques, sérologiques, physiologiques et biochimiques. La classification selon les critères sérologiques de Sherman distinguait quatre groupes: les streptocoques pathogènes ou à hémolyse  $\beta$  et appartenant aux groupes sérologiques de Lancefield A, B, C, D, E, F,G et H (groupes pyogènes), les streptocoques oraux à hémolyse  $\alpha$  ou  $\gamma$ , non groupables par la méthode de Lancefield (1933) et appartenant au groupe K (groupe viridans), les streptocoques non hémolytiques appartenant au groupe sérologique N (groupe lactiques), et les streptocoques fécaux à hémolyse  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  appartenant au groupe sérologique D (groupe des entérocoques). Sur la base de la taxonomie moléculaire, le genre *Streptococcus* a connu d'importantes révisions et les streptocoques ont été séparés en trois groupes génétiquement distincts qui sont: *Streptococcus* au sens strict du terme, *Enterococcus* et *Lactococcus* (Schleifer et Kilpper-Bälz, 1984, 1987). De nos jours, le genre *Streptococcus* comprend les streptocoques pathogènes et oraux. *Streptococcus thermophilus* (non groupable par la méthode de Lancefield) est la seule espèce du genre impliquée dans la fermentation des produits alimentaires comme le yaourt et le fromage. Cette espèce se caractérise par sa croissance thermophile (45-50°C) avec un optimum à 42-43°C, sa thermorésistance à 60-65°C pendant 30 mn (Garvie, 1984; Stiles et Holzapfel, 1997), une activité fermentaire limitée à quelques sucres (glucose, lactose, saccharose) et une forte sensibilité au NaCl (Hardie, 1986).

**Tableau IV:** Principales caractéristiques phénotypiques des bactéries lactiques (Sources: Balows *et al.*, 1992; Novel, 1993; Wood and Holzapfel, 1995; Euzéby, 2004)

Caractéristiques	Principaux genres								
	<i>Aerococcus</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Weissella</i>
Morphologie des cellules	Cocci en tétrade	Bacille	Cocci	Bacille coccobacille	Cocci	Cocci, coccobacilles	Cocci en tétrade	Cocci coccobacille	Bacille/Cocci
CO <sub>2</sub> à partir du glucose	-	-	-	+/-	-	+	-	-	+
Hydrolyse de l'arginine	nd	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	nd
Croissance à 10°C	+ -	+	+	+/-	+	+	+/-	-	+
Croissance à 45°C	-	-	+	+/-	-	-	+/-	+/-	+
Croissance en présence de 6,5% NaCl	+	nd	+	+/-	-	+/-	+/-	-	+ /-
Croissance à pH 4,4	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+	-	+/-
Croissance à pH 9,6	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Isomère d'acide lactique produit	L	L	L	D, L, DL	L	D	L, DL	L	D, DL
Production de dextrane à partir du saccharose	nd	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-
G+C% de l'ADN	nd	33-37	37-43	32-55	34-43	36-43	34-42	34-46	nd

+ : positif dans 90% des cas au moins; - : négatif dans 90% au moins; nd : non disponible ; +/- : positif ou négatif selon les espèces et les souches

#### **I.4.3.4 Le genre *Lactococcus***

Ce genre a été créé par Schleifer *et al.* (1985) pour désigner la plupart des streptocoques lactiques mésophiles du groupe N. Les lactocoques sont de loin les bactéries les plus utilisées en fermentation industrielle principalement celle des produits laitiers. La première étude sur les lactocoques a été réalisée en 1873 par Joseph Lister qui a tenté de prouver la théorie des modifications fermentaires de Pasteur avec l'isolement et l'identification de la première espèce *Bacterium lactis* (de nos jours *Lactococcus lactis*). L'habitat naturel des lactocoques est le lait et produits laitiers et les végétaux. Les cellules sont sphériques ou ovoïdes, en paires ou en chaînes plus ou moins longues, anaérobies facultatives à microaérophiles. Avec une température optimum de croissance proche de 30°C, elles se développent à 10°C (mais pas à 45°C), ont un métabolisme homofermentatif avec production d'acide L(+) lactique à partir du glucose. Elles ne se développent pas en présence de NaCl à 6,5 % ou lorsque le pH est supérieur à 9,6. Les sous-espèces *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* ont une grande importance économique car elles sont utilisées comme cultures starter dans les industries laitières. La sous-espèce *lactis* se différencie de la sous-espèce *cremoris* par sa capacité à croître à 40°C, en présence de NaCl à 4%, de bleu de méthylène à 0,1% et à pH 9.2, et par la production d'ammoniaque à partir de l'arginine (Teuber, 1995).

#### **I.4.3.5 Le genre *Enterococcus***

Ce genre a été proposé pour la première fois par Schleifer et Kilpper-Bälz (1984) pour regrouper les streptocoques fécaux du groupe D de Lancefield notamment *Streptococcus faecalis* et *S. faecium*, actuellement appelés *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* respectivement. Ce genre comprend de nos jours 13 espèces reconnues (Devriese *et al.*, 1991). Les entérocoques sont généralement localisés dans le tractus intestinal de l'homme et des animaux. *E. faecium* et *E. faecalis* sont largement distribués dans l'environnement et sont également associés aux produits végétaux (Martin et Mundt, 1972). Les cellules sont sphériques ou ovoïdes, en paires ou en courtes chaînes, généralement immobiles; elles sont anaérobies facultatives ou strictes, avec un métabolisme homofermentatif produisant de l'acide L(+) lactique à partir du glucose, et tirent également de l'énergie à partir de la dégradation des acides aminés. Certaines espèces excrètent des polysaccharides solubles ou insolubles sous forme de capsules. Leur particularité est la croissance en présence de NaCl à 6,5%, à pH 9,6, la croissance à 10°C et à 45°C et la survie à un traitement thermique de 60°C pendant 30 minutes (Schleifer et Kilpper-Bälz, 1987). L'importance des entérocoques dans le domaine alimentaire résulte de leur utilisation comme indicateur en sécurité sanitaire des aliments, et de leur possible implication dans les



maladies d'origine alimentaire (Stiles, 1989). Ils sont également utilisés comme cultures starter et comme probiotiques pour prévenir et traiter certains troubles intestinaux de l'homme (Lewenstein *et al.*, 1979) et des animaux (Ushe et Nagy, 1985). De nombreuses espèces d'*Enterococcus* sont d'origine clinique, mais les espèces pigmentées sont principalement d'origine végétale (Stiles et Holzapfel, 1997).

#### **I.4.3.6 Le genre *Leuconostoc***

Selon la classification d'Orla-Jensen (1919) les leuconostocs étaient décrits comme des cocci hétérofermentaires appartenant au genre *Betacoccus*. Les cellules, de morphologie variable selon les conditions de culture (sphériques, ovoïdes ou lenticulaires) sont en paires ou en courtes chaînes, immobiles, anaérobies facultatives (Garvie, 1986a). Leur ADN contient 38 à 44 % de G+C et sur le plan phylogénétique les *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus* sont étroitement liés et forment un super groupe dans la subdivision « Clostridium » des bactéries Gram-positif (Novel, 1993; Dellaglio *et al.*, 1995). Les espèces sont hétérofermentaires et produisent de l'acide D(-) lactique, de l'éthanol, de l'acide acétique et du CO<sub>2</sub> à partir du glucose, contrairement aux lactocoques qui produisent du L(+) lactate, et aux lactobacilles hétérofermentaires qui produisent du DL lactate (Holzapfel et Schillinger, 1991). Dans les produits fermentés d'origine végétale, les leuconostocs figurent généralement parmi les premiers microorganismes qui initient la fermentation puis par la suite, sont remplacés par des lactobacilles acide-tolérants (Stamer, 1975). Ils se caractérisent aussi par la production de diacétyle et parfois d'acétate à partir du citrate et par la synthèse de dextrans et de levanes en présence de saccharose, d'où leur utilisation en industrie et en médecine (Holzapfel et Schillinger, 1991). Les leuconostocs sont généralement associés aux grains et à la fermentation de whisky de malt (Priest et Pleasants, 1988), de même qu'à la fermentation des boissons traditionnelles africaines (Sanni et Oso, 1988).

#### **I.4.3.7 Le genre *Weisseilla***

Des études phylogéniques basées sur les séquences des ARNr 16S et 23S ont montré que les espèces du genre *Leuconostoc* étaient hétérogènes et pouvaient être subdivisées en trois groupes : un groupe formé par *Leuconostoc paramesenteroides*, un second formé par *Leuconostoc oeni* (actuellement classé dans le genre *Oenococcus*) et un troisième groupe formé par *Leuconostoc mesenteroides*. Ces études ont également révélé que cinq espèces hétérofermentaires du genre *Lactobacillus* (*Lact. confusus*, *Lact. halotolerans*, *Lact. kandleri*, *Lact. minor* et *Lact. viridescens*) étaient apparentées à *Leuconostoc paramesenteroides*

(Schillinger *et al.*, 1989; Euzéby, 2004). En réalisant une étude taxonomique sur des souches bactériennes isolées de saucissons secs grecs et sur la base des séquences des ARNr 16S, Collins *et al.* (1993) ont classé ces souches bactériennes dans le groupe constitué par *Leuconostoc mesenteroides* et les cinq espèces de *Lactobacillus* hétérofermentaires. Sur la base de ces travaux, Collins et ses collaborateurs (1993) proposèrent le nouveau genre *Weissella* pour ces espèces et les combinaisons *Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella kandleri*, *Weissella minor* et *Weissella viridescens* ont été proposées pour reclasser respectivement *Lact. confusus*, *Lact. halotolerans*, *Lact. kandleri*, *Lact. minor* et *Lact. viridescens*; *Weissella paramesenteroides* et *Weissella hellenica* ont été proposées pour les souches isolées du saucisson grec. Les cellules des bactéries du genre *Weissella* sont de courts bacilles, des coccobacilles ou des coques ovoïdes, isolées, en paires ou en courtes chaînes, Gram-positif, non sporulées, immobiles, catalase-négative, oxydase-négative, aéro-anaérobies ou microaérophiles, hétérofermentaires stricts, cultivant à 15°C et ayant des exigences nutritionnelles complexes (Euzéby, 2004).

Le genre *Oenococcus* a été proposé par Dicks *et al.* (1995) avec *Oenococcus oeni* comme espèce type pour les souches de *Leuconostoc Oenos* isolées du vin, à cause des différences physiologiques observées avec les autres *Leuconostocs*. Typiquement acidophiles, cultivant en milieu acide (pH 3,5-4,8) et tolérant jusqu'à 10% d'éthanol, ces bactéries sont responsables de la fermentation malolactique des vins et cidres, où la L malate est convertie en L(+) lactate et CO<sub>2</sub>, alors que D(-) lactate est produit à partir du glucose par tous les *Leuconostoc spp.* Les genres *Carnobacterium* (lactobacilles sensibles aux acides), *Tetragenococcus* (précédemment *Pediococcus halophilus*) et *Vagococcus* (précédemment streptocoques mobiles du group N) forment un groupe phylogénique proche du genre *Leuconostoc* (Stiles et Holzapfel, 1997).

#### **I.4.4 Méthodes d'identification des bactéries lactiques**

##### **I.4.4.1 Méthodes basées sur les caractéristiques phénotypiques**

Les méthodes phénotypiques d'identification et de classification regroupent toutes les méthodes qui n'impliquent pas le matériel génétique (ADN, ARN), y compris les méthodes chemotaxonomiques. La chemotaxonomie consiste en la classification des bactéries selon les composants chimiques de la cellule ou « empreinte chimique ». Elle utilise des méthodes analytiques physico-chimiques pour collecter les informations sur divers constituants chimiques

de la cellule, comme les profils des protéiques, des acides gras de la paroi cellulaire, des enzymes, le spectre infra-rouge, le typage de la muréine, les quinones ... (Vandamme, *et al.*, 1996). Les méthodes physico-chimiques complètent l'analyse phénotypique classique, et leur pouvoir discriminant s'étend de la souche à l'espèce. L'analyse phénotypique classique constitue la première étape de description d'un microorganisme. Elle est basée sur l'étude des caractéristiques morphologiques aussi bien des cellules (forme, dimension, mode d'association, endospore, mobilité, inclusions, production de capsules ou de pigments, ...) que des colonies (forme, couleur, dimension...), et des caractéristiques physiologiques et biochimiques du microorganisme (Guiraud, 1998; Klein *et al.*, 1998). Pour les bactéries lactiques, les caractéristiques physiologiques et biochimiques généralement utilisées sont:

- la croissance à différentes températures, valeurs de pH, concentrations en NaCl, conditions atmosphériques (aérobie, anaérobie),
- la croissance en présence de certaines substances (bile, bleu de méthylène, éthanol...),
- l'activité enzymatique présente (catalase, pseudocatalase, phosphatase alcaline,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase, glucose-6-phosphate déshydrogénase...), l'activité lipolytique...,
- la métabolisation de certaines substances (sucres, arginine, esculine, urée...),
- la production de métabolites ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , acide lactique, éthanol, acétoïne, polysaccharides...) à partir de glucose, du citrate ou d'autres substrats,
- la recherche de caractères particuliers comme l'analyse sérologique (l'hémolyse  $\alpha$  ou  $\beta$ ),
- la réduction du tétrazolium, du tellurite de potassium, la décarboxylation de la tyrosine, ... (Curk *et al.*, 1994; Guiraud, 1998).

Les tests biochimiques peuvent être réalisés par des méthodes conventionnelles classiques ou par des microméthodes. Ces dernières se distinguent des précédentes par leur miniaturisation, leur standardisation, leur rapidité mais également par le fait qu'un document ou un programme informatique permet d'interpréter les résultats. Les galeries ou kits API 50 CHL (BioMerieux) sont un exemple de méthodes miniaturisées destinés à l'identification des bactéries lactiques en cours de croissance (Collins *et al.*, 1987; Pardo *et al.*, 1988) ; la galerie API ZYM est également un exemple de microméthode pour la réalisation de tests rapides pour la mise en évidence d'enzymes, pouvant être appliquée sur les bactéries lactiques (Milliere *et al.*, 1989).

Les principales caractéristiques chimiques généralement utilisées pour l'identification des bactéries lactiques sont: le profil protéique, le profil des acides gras des parois cellulaires, le spectre Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF).

**-Le profil protéique:** l'électrophorèse des protéines est une méthode très sensible qui permet de différencier la bactérie au niveau de l'espèce ou de la sous-espèce, et dans certains cas, au niveau des souches d'une même espèce (Towner et Cockayne, 1993). La séparation du mélange protéique cellulaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) donne un électrophorégramme ou profil protéique qui est considéré comme l'empreinte (fingerprint) de la souche bactérienne. En présence du sodium dodécyl sulfate (SDS), les protéines cellulaires sont séparées sur la base de leur masse. Le principe de la méthode SDS-PAGE a été initialement décrite par Laemmli (1970) et depuis plus d'une vingtaine d'années, l'électrophorèse des protéines cellulaires (SDS-PAGE) est appliquée avec succès en taxonomie bactérienne (Jackman, 1987; Vandamme *et al.*, 1996).

**-Le profil des acides gras des parois:** l'analyse des acides gras des lipides de la paroi bactérienne par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire peut permettre d'identifier les bactéries. Toutefois, la composition en acides gras des parois bactériennes est influencée par l'apport nutritionnel des cellules (Farshtchi et Mc Clunk, 1970), la température (Drücker et Veazey, 1977), l'aération (Drücker et Owen, 1973) et l'âge des cellules (Lonvaud-Funel et Desens, 1990), d'où l'importance de conditions de culture bien établies et normalisées. Les lactobacilles et les pédiocoques sont caractérisés par une prédominance d'acides gras à longues chaînes linéaires saturées ou mono insaturées, très souvent à nombre pair d'atomes de carbone et d'acides gras cyclopropanoïques. L'acide 11,12-méthylène octadécanoïque, encore appelé acide lactobacillique est caractéristique de la famille des *Lactobacillaceae* (Lechevalier, 1977). L'analyse qualitative de la composition en acides gras des parois ne permet pas de différencier les espèces du genre *Lactobacillus*; toutefois l'évaluation quantitative à partir des chromatogrammes améliore la discrimination des lactobacilles au niveau des espèces (Decallone *et al.*, 1991).

**-Les spectres Infra-Rouges à Transformée de Fourier (IRTF):** les propriétés d'absorption des cellules bactériennes entières dans le moyen infra-rouge (4000 à 500  $\text{cm}^{-1}$ ) peuvent constituer un moyen d'identification des souches bactériennes, dans la mesure où chaque individu bactérien possède un spectre IRTF spécifique et reproductible (Naumann *et al.*, 1991, Orsini *et al.*, 2000). Ces spectres correspondent aux caractéristiques vibrationnelles de tous les constituants cellulaires (paroi, membrane, protéines, polysaccharides, acides gras, acides nucléiques, etc.). Le spectre IRTF permet une différenciation intergénérique et interspécifique (Helm *et al.*, 1991; Bounaix, 1992). Cette méthode est rapide, sensible et informatisable et permet d'étudier en

parallèle un grand nombre de souches bactériennes. Cependant, elle est limitée par sa dépendance aux conditions de culture qui doivent être rigoureusement normalisées, car le spectre IRTF d'une bactérie est fonction de sa composition cellulaire (Curk *et al.*, 1994).

#### **I.4.4.2 Méthodes basées sur les caractéristiques génétiques**

Le génome des bactéries est formé d'une molécule d'ADN chromosomique stable qui caractérise l'espèce bactérienne, et souvent de plusieurs molécules d'ADN plasmidiques instables dont la perte spontanée ou provoquée entraîne la perte des caractères qui leur sont associés. Par la connaissance de la structure du chromosome, mémoire cellulaire et témoin de l'évolution, il est possible de vérifier les relations phylogéniques qui existent entre les organismes et d'établir une taxonomie permettant non seulement d'identifier un organisme, mais également de le situer par rapport aux autres (Wayne *et al.*, 1987). Les plasmides ne déterminent que des caractères phénotypiques de biotype au sein d'une espèce et n'ont pas de portée taxonomique, néanmoins leur mise en évidence permet de distinguer des biovars. La structure de l'ARN ribosomique joue un rôle clé dans la vie bactérienne et s'avère être un véritable chronomètre de l'évolution et un outil taxonomique permettant de mieux délimiter les relations phylogéniques entre les organismes et de préciser leur identification (Curk *et al.*, 1994). Les principales caractéristiques génétiques utilisées pour l'identification bactérienne et particulièrement les bactéries lactiques sont: le contenu en guanine et cytosine (G+C%) de l'ADN, l'hybridation ADN-ADN, l'hybridation ADN-ARN, la séquence de l'ARNr, les sondes oligonucléotidiques et l'analyse du chromosome entier.

**-Le contenu en guanine et cytosine (G+C%) de l'ADN chromosomique:** la composition en bases azotées, exprimée en pourcentage molaire des bases guanine (G) et cytosine (C) par rapport à l'ensemble des bases (adénine, thymine, guanine et cytosine) est la première particularité de l'ADN exploitée en taxonomie bactérienne. Le G+C% est surtout utilisé pour caractériser une espèce ou pour établir des parentés entre espèces. Il est constant pour un microorganisme donné, mais varie d'un microorganisme à l'autre; il varie entre 24 et 76% dans le monde bactérien (Vandamme *et al.*, 1996). Généralement la différence de G+C% observée n'est pas supérieure à 3% à l'intérieur d'une espèce bien définie, et n'est pas supérieure à 10% à l'intérieur d'un genre bien défini (Stackebrandt et Leisack, 1993). Toutefois, deux souches ayant le même G+C% ne sont pas forcément semblables car cette valeur ne prend pas en compte l'arrangement linéaire des nucléotides dans l'ADN (Curk *et al.*, 1994).

**-L'hybridation ADN-ADN:** la mesure de l'homologie entre ADN totaux est la seule méthode de regroupement bactérien officiellement reconnue (Wayne *et al.*, 1987). Le principe de l'hybridation ADN-ADN repose sur la dénaturation de molécules d'ADN totaux appartenant à deux souches A et B, puis à leur réappariement. La formation d'hétéroduplex (brin de la souche A + brin de la souche B) sera gouvernée par le degré de ressemblance des deux souches. Le pourcentage de réassociations hétérologues est ensuite calculé. La stabilité thermique [ $\Delta T_m = T_m$  (homoduplex) -  $T_m$  (hétéroduplex)] est un paramètre important car elle permet de mesurer le degré de mauvais réappariement au sein de l'hétéroduplex. Le  $T_m$  est la température de demi-dénaturation de la molécule d'ADN double brin, c'est-à-dire la température à laquelle la moitié des brins se trouve à l'état monocaténaire (Towner et Cockayne, 1993; Curk *et al.*, 1994). L'espèce qui est l'unité de base en taxonomie bactérienne, est définie comme un groupe de souches microbiennes ayant en commun au moins 70% d'homologie ADN-ADN, avec 5°C ou moins de  $\Delta T_m$  ; il est admis qu'au dessus de 70% d'homologie, deux souches sont de la même espèce (Wayne *et al.*, 1987). Cependant le niveau exact permettant d'affirmer que deux bactéries sont d'espèces différentes varie (Zakrzewska-Czerwinska *et al.*, 1988). Lorsque des espèces bactériennes ont des propriétés phénotypiques communes, une homologie de 30 à 65% vient renforcer l'idée qu'elles appartiennent au même genre (Curk *et al.*, 1994). L'hybridation ADN-ADN s'applique généralement à des bactéries très apparentées et permet de faire des regroupements bactériens au niveau de l'espèce et de la sous-espèce. Cette technique a beaucoup contribué à la description correcte de nouvelles espèces et s'est montré indispensable à la détermination des espèces du genre *Lactobacillus* (Vandamme *et al.*, 1996).

**-L'hybridation ADN-ARN:** au cours de la synthèse des protéines, l'ADN est transcrit en ARN messager (ARNm) dont la séquence sera lue par les ribosomes pour donner une chaîne d'acides nucléiques constituant la future protéine. Les ARNm ont été très peu utilisés en identification bactérienne car ils sont difficiles à extraire des bactéries du fait de leur instabilité et de leur fragilité; de plus les résultats obtenus sont similaires à ceux de l'hybridation ADN-ADN (Curk *et al.*, 1994). Par contre, les ARN ribosomiaux (ARNr 5S, 16S, 23S) constituent des molécules de choix pour les hybridations ADN-ARNr. Leurs molécules constituent des portions de génome présentes dans tous les organismes qui détiennent une fonction essentielle de la cellule vivante avec des potentialités de variations de structures très limitées (Grimont et Grimont, 1986; Woese, 1987). De par leur rôle clé dans la vie de la bactérie, les ARNr sont produits en grandes quantités et sont facilement isolables. Leur fonction étant commune à tous les microorganismes, leur

séquence comporte des régions conservées permettant de détecter des similarités entre des microorganismes éloignés. L'hybridation ADN-ARNr n'a pas connu une application intensive comme l'hybridation ADN-ADN, mais elle a été à l'origine de la création de nouveaux genres et de réarrangement au sein des genres (Curk *et al.*, 1994).

De nos jours cette méthode permet d'identifier et de compter des microorganismes dans leur environnement sans avoir besoin de les cultiver et a ainsi permis des avancées considérables en écologie microbienne (Amann *et al.* 1995).

**-La séquence de l'ARNr :** l'hybridation ADN-ARNr n'utilise qu'une faible potentialité des ARNr alors que la séquence peut apporter plus d'informations. L'ARNr possède des propriétés pour servir d'outil couvrant tous les niveaux taxonomiques du règne à l'espèce. Par l'existence de zones ayant des contraintes différentes, l'ARN 16S ressemble à une horloge à plusieurs aiguilles: celles correspondant aux zones les plus conservées se déplaçant lentement et permettent de suivre l'évolution sur de longues périodes, et celles correspondant aux zones plus variables permettent de différencier des groupes d'organismes plus voisins. De plus, au niveau des régions conservées, il existe des séquences caractéristiques de grands groupes de bactéries. Ces séquences, appelées « séquences signatures » permettent d'établir des relations entre des organismes distants au plan phylogénique (Woese, 1987; Towner et Cockayne, 1993).

Parmi les méthodes de séquençage rapide de l'ARN qui ont été développées, deux d'entre elles sont les plus utilisées:

- la technique de la transcriptase reverse: elle consiste à hybrider à la molécule d'ARNr 16S extraite, un oligonucléotide très conservé qui va servir d'amorce à la transcriptase reverse, enzyme d'origine virale qui va synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN (Lane *et al.*; 1985). L'ADNc est alors séquencé par la méthode de Sanger *et al.*, (1977).

- la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction) de Saiki *et al.* (1988) qui permet d'obtenir en très grande quantité une région d'ADN dans laquelle ont été définies des séquences bordantes. Ces séquences bordantes vont servir d'amorces à une ADN polymérase qui va synthétiser le brin correspondant à l'ADN présent entre les amorces (Newton et Graham, 1994). L'utilisation des amorces définies par Lane *et al.* (1985) a permis d'obtenir, à partir de très faibles quantités d'ADN de la souche à étudier, des fragments d'ADN séquençables par la méthode de Sanger *et al.*(1977).

**-Les sondes oligonucléotidiques:** une sonde oligonucléique est un fragment d'acide nucléique à un seul brin qui s'hybride de façon spécifique aux régions complémentaires de l'acide nucléique

cible (molécule d'ADN simple brin ou d'ARN ribosomique). Le polymorphisme de restriction de l'ADN ou « Restriction Fragment Length Polymorphism » (RFLP), consiste à extraire l'ADN des cellules bactériennes, à le faire couper par des enzymes de restriction d'origine bactérienne, puis à le faire migrer sur gel d'agarose, avant de le transférer sur des filtres qui serviront de support lors de l'hybridation avec la sonde. Cette technique permet des études de polymorphisme par la comparaison des tailles des fragments d'une région particulière du chromosome. Elle permet de vérifier l'appartenance d'une souche à une espèce ou à une sous-espèce (Köhler *et al.*, 1991). L'utilisation de sondes correspondant à des régions à fort polymérisation ou à des séquences d'insertion, peut également permettre de différencier les souches à l'intérieur d'une espèce ou d'une sous-espèce. L'une des meilleures approches consiste à utiliser des sondes dirigées contre les ARN 16S et 23S, car leur spécificité s'étend de l'espèce (et même de la souche) aux plus hauts niveaux taxonomiques. La sensibilité de cette technique est considérablement augmentée si les cellules se trouvent en phase de croissance exponentielle, pendant laquelle, il ya dix mille fois plus de molécules d'ARNr que d'ADN (Curk *et al.*, 1994). Des oligonucléotides spécifiques du groupe, du genre, de l'espèce, et même parfois de la sous-espèce peuvent être conçus.

**-L'analyse du chromosome entier :** l'apparition de l'électrophorèse de l'ADN en champ pulsé ou Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) a révolutionné l'analyse des génomes bactériens en permettant une étude du génome dans sa globalité, où l'ADN chromosomique est purifié *in situ* après la lyse des cellules dans une matrice d'agarose (Schwartz *et al.*, 1983; McClelland *et al.*, 1987). Contrairement à l'électrophorèse classique sur gel d'agarose qui repose sur l'effet tamisant du gel pour séparer les molécules d'ADN selon leur taille, l'électrophorèse en champ pulsé ou PFGE se base sur les propriétés physico-chimiques de l'ADN. Lorsque l'ADN est soumis à un champ électrique, il s'oriente parallèlement à ce champ avant de commencer sa migration dont l'intensité est proportionnelle à la taille de l'ADN. Le principe du PFGE consiste donc à appliquer un champ électrique dans des directions différentes, afin d'obliger les molécules d'ADN à se réorienter après chaque changement de direction du champ; les molécules les plus grandes se réorientant plus lentement que les petites. Les changements successifs de direction du champ conduisent à une séparation des molécules selon leur taille, puis après révélation au bromure d'éthidium, l'ADN est visualisé en lumière ultraviolette (Towner et Cockayne, 1993; Curk *et al.*, 1994). Le pouvoir séparatif et résolutif est influencé par le temps de commutation c'est à dire le temps d'application du champ dans une direction, et l'angle entre les deux champs (Smith et Condemine, 1990). La modification de certains paramètres tels que la



température, le voltage, la concentration en agarose et la force ionique peut agir de manière interdépendante, mais non uniforme sur la mobilité de molécules d'ADN de différentes tailles. Le PFGE constitue actuellement la méthode de choix pour déterminer la taille du génome bactérien, identifier et comparer des souches par analyse des profils de restriction, et construire des cartes physiques de chromosomes bactériens. Les profils de restriction générés par électrophorèse en champ pulsé constituent de véritables « empreintes génomiques » utilisées pour l'identification des souches, ainsi que la détection de souches apparentées (Towner et Cockayne, 1993).

La méthode Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ou polymorphisme d'amplification de l'ADN permet également d'obtenir de façon simple et rapide des empreintes génomiques de la totalité du chromosome. Cette technique est basée sur l'amplification de séquences génomiques par PCR en utilisant des amorces non spécifiques (Welsh et McClelland, 1990).

#### **I.4.4.3 La taxonomie numérique**

Le principe de la taxonomie numérique a été proposé par Adanson en 1763. En donnant à chaque caractère le « même poids » ou valeur taxonomique, il est possible d'exprimer numériquement les distances taxonomiques entre les organismes, en termes de caractères par rapport au nombre total de caractères étudiés. Plus le nombre de caractères étudiés est grand, plus les distances déterminées ont une signification. La taxonomie numérique a été revalorisée avec le développement de l'outil informatique et son application a connu du succès, surtout par la détermination des « clusters » ou groupes de souches homogènes, et par l'intégration de différentes sortes de données que ce soit morphologiques, physiologiques, antigéniques, génétiques....

La classification numérique s'établit de la manière suivante:

- chaque souche étudiée est appelée unité taxonomique opérationnelle ou Operational Taxonomic Unit (OTU);
- les données obtenues pour chacun des caractères étudiés sont codées et la similarité entre les souches est calculée ;
- ces données numériques sont rassemblées dans une matrice de similarité, à partir de laquelle, une structure taxonomique est établie. Cette structure taxonomique se calcule par une méthode appelée analyse de groupes homogènes ou « clusters study »;

-les résultats obtenus conduisent à la construction d'un dendrogramme ressemblant à un arbre dans lequel les plus petits embranchements représentent les clusters d'unités taxonomiques opérationnelles les plus similaires.

Le principe du « clusters study » est de chercher dans la matrice de similarité les plus hautes valeurs indiquant les paires d'unités taxonomiques opérationnelles (OTU) les plus similaires. Les autres unités taxonomiques opérationnelles sont progressivement ajoutées aux différents clusters formés au début jusqu'aux pourcentages de similarité les plus bas (Curk *et al.*, 1994).

#### **I.4.4.4 La taxonomie polyphasique**

L'expression « taxonomie polyphasique » a été proposée par Colwell (1970), puis adoptée par consensus dans l'objectif d'intégrer différentes sortes de données et d'informations phénotypiques, génotypiques et phylogéniques pour la description et l'identification des taxons à tous les niveaux, de la famille à la souche en passant par le genre et l'espèce (Murray *et al.*, 1990). Les termes « classification polyphasique » et « identification polyphasique » peuvent être utilisés dans le même contexte. Les données génotypiques sont relatives aux acides nucléiques (ADN, ARN); les données phénotypiques se réfèrent aux protéines et leurs fonctions, aux marqueurs chimiotaxonomiques (lipides et acides gras, quinones, polyamines, exopolysaccharides, constituants de la membrane cellulosique, ...) et à une large gamme de facteurs exprimés de nature morphologique, physiologique, enzymologique ou sérologique. Toutes les données qui informent sur la nature biologique de la souche méritent la même attention. L'approche polyphasique a toute son importance car, il n'y a pas une norme phylogénique pour la description d'une espèce, d'un genre ou d'une famille, ni une norme pour identifier une espèce bactérienne (Vandamme *et al.*, 1996). Les contours d'une espèce bactérienne en taxonomie polyphasique sont moins clairs que ceux définis dans le passé par Wayne *et al.* (1987), et prennent en compte plus d'éléments qu'auparavant. L'espèce bactérienne apparaît comme un assemblage d'isolats de souches issus d'une population ancestrale commune, dans laquelle une production constante de diversité génétique résulte de cultures clonales avec différents degrés de recombinaison ; cette diversité génétique est caractérisée par un certain degré de cohérence phénotypique et par un degré significatif d'hybridation ADN-ADN avec plus de 97% d'homologie par séquençage de l'ARNr 16S (Vandamme *et al.*, 1996). La classification polyphasique ne suit aucune règle ou indication stricte, sauf qu'elle peut intégrer toute information significative sur le microorganisme et résulte d'une sorte de consensus de

classification. La taxonomie polyphasique n'est empêchée par aucun préjugé conceptuel, sauf que plus on intègre des informations sur un groupe de microorganismes, mieux le résultat reflète ses réalités biologiques.

La taxonomie polyphasique qui constitue de nos jours un outil essentiel en taxonomie bactérienne moderne (Klein *et al.*, 1998; Rodas *et al.*, 2005), a été utilisé pour nos travaux d'identification, en combinant des données phénotypiques et génotypiques.

## **I.5 Les risques liés à la fermentation lactique**

Bien qu'ayant de nombreux avantages sur les plans nutritionnel, organoleptique et sécurité sanitaire des aliments, la fermentation lactique présente cependant quelques inconvénients. Les bactéries lactiques peuvent libérer des métabolites toxiques ou indésirables au cours de la fermentation.

Des amines biogènes comme l'histamine, la putrescine, la tryptamine, la tyramine, la cadavérine, l'agmatine... peuvent être produites au cours du processus de fermentation des aliments et boissons. Leur formation se fait soit par décarboxylation directe d'acides aminés libres par les souches aminoacide décarboxylases positives, soit par modification d'autres amines (Farias *et al.*, 1995, Lucas *et al.*, 2003). Ces amines biogènes présentent des risques sanitaires pour l'homme comme par exemples des allergies, des troubles respiratoires, la vasodilatation, des troubles neurologiques, la palpitation, l'hypertension ou l'hypotension artérielle (Silla Santos, 1996). La production d'amines biogènes a été mise en évidence dans divers produits alimentaires fermentés (kenkey, vin, cidre, fromage, légumes fermentés, saucisses, bière, produits fermentés traditionnels) et les espèces généralement impliquées appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Oenococcus* (Nout *et al.*, 1994; Soufleros *et al.*, 1998; Gloria et Izquierdo-Pulido, 1999; Lonvaud-Funel, 2001; Öner *et al.*, 2004; Garai *et al.*, 2007 ). Certaines espèces bactériennes associées à ces fermentations ont la capacité de dégrader l'histamine et la tyramine en produisant la mono ou di-amino-oxydase (Leuschener *et al.*, 1998). Les amines biogènes contribuent aussi à l'altération des caractéristiques organoleptiques des produits tels que le goût et l'odeur.

La nature de l'isomère d'acide lactique produit durant la fermentation, qui dépend de l'espèce bactérienne, est également préoccupante. Certaines espèces des genres *Leuconostoc* spp., *Weissella* spp. et certaines souches de *Lact. delbrueckii* produisent l'acide D(-) lactique, non digestible dans l'organisme humain car non hydrolysable par les lactate-déshydrogénases

humaines, de sorte que de fortes concentrations peuvent provoquer des acidoses (Holzapfel, 2002). La dose maximale recommandée de cet acide non physiologique est de 100 mg/kg de corps /jour (FAO, 1968).

Malgré ses effets antimicrobiens, la fermentation lactique n'arrive pas souvent à éliminer et/ou inhiber la croissance de tous les microorganismes pathogènes notamment certaines bactéries entéropathogènes acidotolérants comme *E. coli* O157 : H7 et certains rotavirus qui peuvent résister à la fermentation (Motarjemi, 2002). Enfin, même si la plupart des bactéries lactiques qui interviennent dans la fermentation ont généralement le statut GRAS « Generally Recognized As Safe » (Klaenhammer *et al.* 2005), quelques espèces sont souvent incriminées dans certaines pathologies (Mackay *et al.*, 1999 ; Rautio *et al.*, 1999).

Pour minimiser les risques liés aux produits fermentés et accroître d'avantage la sécurité sanitaire de ces produits, la sélection de souches bactériennes appropriées pour la conduite de la fermentation contrôlée est plus que nécessaire, afin de préserver la santé du consommateur. Toutefois, la qualité et la sécurité sanitaire d'un produit fermenté dépendent de certains facteurs à savoir, la qualité de la matière première, son niveau de contamination initial, le niveau d'application des règles d'hygiène, les conditions de fermentation comme la température, la qualité de la culture starter, le degré d'acidité atteint (Motarjemi, 2002).

## **I.6 La sélection de cultures starter pour l'optimisation de la fermentation**

Selon Holzapfel (1997), une culture starter peut être définie comme une substance ou une préparation contenant des microorganismes adaptés, pouvant être ajoutée à un substrat pour accélérer ou faciliter la maîtrise du processus de fermentation et assurer la qualité des produits. La maîtrise du processus de fermentation consiste à favoriser une flore utile au détriment d'une flore indésirable afin de prévenir les risques sanitaires chez les consommateurs. Les cultures starter modernes sont des monocultures ou des cultures mixtes de microorganismes spécifiquement adaptées au substrat.

Dans les unités artisanales, la fermentation est naturelle non contrôlée et résulte de l'activité compétitive d'une variété de microorganismes où les mieux adaptés au substrat et aux conditions techniques et environnementales vont dominer le processus de fermentation. L'initiation de la fermentation naturelle non contrôlée prend un temps relativement long avec des risques d'échec élevés. Durant cette phase initiale qui est associée à la phase latente de croissance des microorganismes, la microflore originelle de la matière première, des ustensiles et de l'environnement se développent et produisent des métabolites. Cette phase peut être

raccourcie en utilisant un inoculum soit par la technique du « pied de cuve » soit par l'utilisation de cultures starter sélectionnées. Certaines technologies traditionnelles utilisent un ferment local collecté à partir d'une production précédente, ou bien pratiquent la technique du « pied de cuve » (Holzapfel, 1997); c'est le cas de la fermentation alcoolique des bières traditionnelles Africaines. La technique du « pied de cuve » consiste à utiliser une portion du produit fermenté de la production précédente pour initier la fermentation d'un substrat neuf. Cette technique permet de raccourcir la phase initiale du processus de fermentation et limite les risques d'accidents de fabrication. Sa pratique répétée favorise la sélection de souches mieux adaptées ayant des caractéristiques spécifiques intéressantes pouvant être sélectionnées et utilisées comme cultures starter. Les conditions environnementales, la pratique de la technique du « pied de cuve » et l'utilisation répétée d'ustensiles spécifiques peuvent contribuer favorablement à la sélection de populations microbiennes typiques pour un processus de fermentation (Holzapfel, 1997).

La sélection des souches bactériennes comme cultures starters pour une fermentation contrôlée doit tenir compte de certains facteurs comme:

- l'adaptation des souches au substrat; les souches doivent donc être isolées du produit fermenté traditionnel et ne doivent en elles mêmes présenter un risque pour la santé du consommateur;
- les propriétés technologiques bénéfiques aux plans amélioration du processus de fermentation, amélioration des qualités nutritionnelle et organoleptique et la sécurité sanitaire des produits: taux d'acidification ou taux de production d'alcool par exemple, effets bénéfiques des métabolites générés, capacité à dégrader les toxines et les facteurs antinutritionnels, effets probiotics... ;
- la compétitivité, la viabilité et la survie des souches;
- l'antagonisme des souches pour les germes pathogènes et la flore d'altération (Holzapfel, 1997; 2002).

Pour ce qui concerne l'utilisation de souches sélectionnées dans des systèmes de fermentation, des travaux antérieurs ont indiqué une meilleure performance de *Lactobacillus brevis*, *Lact. fermentum*, *Lact. reuteri*, *Lact. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* et *Ped. acidilactici* pour la fermentation lactique des céréales et autres produits végétaux (Steinkraus, 1997; Holzapfel, 1997; Lee, 1997; Oyewole, 1997). Par ailleurs, l'utilisation de *Lactobacillus* spp. comme cultures starter en brasserie pour la fabrication de bières de fermentation lactique est bien connue dans les pays développés. En Allemagne par exemple, le moût est fermenté à 48-50°C avec des souches de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* fermentant le maltose; la

bière *Berliner Weisse* est produite avec *Lact. brevis*; l'acidification du moût de la bière russe *kwass* est également obtenue par fermentation lactique avec des souches de *Lactobacillus* homofermentatives et hétérofermentatives (Hammes *et al.*, 1992). En outre, l'acidification de la bière de sorgho en Afrique du Sud a été expérimentée à 48-50°C avec une souche thermophile de *Lact. delbrueckii* (Haggblade and Holzapfel, 1989). Les cultures starter utilisées en brasserie, sont généralement des souches de *Lact. delbrueckii*, *Lact. amylovorus*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus* et occasionnellement *Lact. helveticus* (Back, 1988). Les cultures starter formulées en monoculture ou en culture mixte doivent d'abord être expérimentées en unité pilote avant leur utilisation en milieu réel de production (Holzapfel, 2002).

Pour les travaux expérimentaux, l'approche polyphasique combinant les caractéristiques phénotypiques et génotypiques (ITS-PCR, RFLP, PFGE, séquençage partiel de l'ADN) a été adoptée pour l'identification des isolats. Quelques propriétés technologiques des isolats ont été déterminées puis des isolats ont été sélectionnés et testés comme cultures starter dans la production de la bière traditionnelle de sorgho.

Les chapitres suivants présentent de manière synthétique les travaux expérimentaux réalisés et les résultats obtenus, lesquels sont publiés sous forme d'articles scientifiques joints en annexe.

**CHAPITRE II**  
**IDENTIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES DOMINANTES**  
**ASSOCIEES AU MALTAGE TRADITIONNEL DU SORGHO**

## Résumé :

Le maltage traditionnel du sorgho qui comprend les opérations de trempage des grains, la germination et le séchage solaire des grains germés, a été étudié à Ouagadougou (Burkina Faso) et à Tamale (Nord Ghana). Des isolats de bactéries lactiques ont été collectés, identifiés et leurs propriétés technologiques ont été déterminées. Le trempage a été caractérisé par une baisse du pH de l'eau et un développement microbien dominé par les bactéries lactiques dont la charge dans l'eau de trempage a augmenté de  $10^5$  à  $10^9$ - $10^{10}$  ufc/ml. Cent soixante dix huit (178) isolats de bactéries lactiques ont été collectés à partir d'échantillons prélevés dans les grains de sorgho, pendant le trempage et dans le malt de sorgho en fin de séchage solaire; leurs caractéristiques biochimiques préliminaires et leurs profils de fermentation des sucres ont été déterminés à l'aide des galeries API 50 CHL. Cent six (106) isolats ont été identifiés par l'analyse de l'ITS-PCR/RFLP de l'ADN et le séquençage partiel de l'ADN. Les résultats ont montré que les isolats dominants appartiennent aux espèces *Lactobacillus fermentum* (58,49% des isolats), *Pediococcus acidilactici* (22,64%), *Weissella confusa* (11,32%), *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* et *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Lact. fermentum*, *Ped. acidilactici* et *W. confusa* ont dominé la fermentation lactique naturelle non contrôlée observée pendant le trempage des grains; simultanément à leur développement et à la baisse du pH, la croissance des bactéries Gram-négatif a été inhibée. Une activité antimicrobienne a été détectée pour 39,62%, 22,64% et 17,92% des isolats envers respectivement *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Listeria innocua*. 37,73% des isolats ont révélé une faible activité amylasique et 90,5 % ont montré la capacité à produire des polysaccharides exocellulaires.

Les isolats de *Lact. fermentum* ont dominé la microflore depuis les grains de sorgho jusqu'au malt de sorgho. La sélection d'isolats appropriés de *Lact. fermentum* et leur utilisation comme culture starters depuis l'étape initiale du maltage (le trempage des grains) peut contribuer à améliorer la qualité sanitaire du malt de sorgho et diriger ultérieurement la fermentation du moût du *dolo* ou la fermentation d'autres produits à base de malt de sorgho comme les formulations infantiles.

**Mots clés :** Sorgho, malt de sorgho, bactéries lactiques, identification, propriétés technologiques.

L'essentiel des résultats a fait l'objet d'un article publié dans la revue *African Journal of Microbiology Research*.



## Introduction

Le sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) a été utilisé depuis des siècles pour le brassage des bières opaques traditionnelles en Afrique (Novellie, 1977) comme le *dolo* et le *pito* qui sont produits respectivement au Burkina Faso et au Ghana. Le sorgho est transformé en malt de sorgho qui est alors utilisé pour le brassage du *dolo* et du *pito*. Le malt de sorgho sert aussi de matière première ou d'ingrédient dans la production d'autres produits alimentaires comme l'*otika*, une boisson non alcoolisée du Nigéria (Chinyere et Onyekwere, 1996), le *gowé*, un aliment fermenté du Bénin (Vieira-Dalodé *et al.*, 2007) et les farines infantiles. L'utilisation du malt de sorgho dans la formulation des farines infantiles a pour principal objectif d'améliorer la qualité nutritionnelle et la densité énergétique des bouillies à base de céréales grâce à l'action des amylases du malt (Malleshi *et al.*, 1989; Onyeka et Dibia, 2002; Mbofung et Fombang, 2004; Traoré *et al.*, 2004). Le maltage peut être défini comme une germination limitée des grains de céréales dans le but de générer des enzymes hydrolytiques (amylases, maltases, protéases ....) pour l'hydrolyse de l'amidon et des protéines des grains. En outre, le maltage modifie la structure du grain afin de faciliter la solubilisation des constituants pendant le brassage et fournit des composés aromatiques et d'autres substances essentielles pour la fermentation et la qualité organoleptique de la bière (Demuyakor et Ohta, 1992; Dewar *et al.*, 1997; Agu et Palmer, 1996). Le maltage du sorgho comprend les opérations de trempage, de germination et de séchage solaire des grains germés (Demuyakor et Ohta, 1992, Mbofung et Fombang, 2004). Au plan microbiologique, le trempage constitue une des étapes critiques du procédé de maltage pendant laquelle la flore originelle des grains prolifère du fait des conditions d'humidité favorables (Noots *et al.*, 1999). Le malt final contient des microorganismes dont certains sont importants pour le brassage mais d'autres sont indésirables ou dangereux pour l'homme (Priest and Campbell, 1996). Ainsi, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp, *Rhizopus*, *Phoma* spp., *Alternaria* spp., *Mucor* spp., *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina* spp. et *Lactobacillus* spp. ont été identifiées dans le sorgho et le malt de sorgho (Ilori *et al.*, 1991; Ogundiwin *et al.*, 1991 ; Lefyedi, 2006). Pour améliorer la qualité microbiologique du malt, des traitements chimiques au formaldéhyde, à l'acide sorbique, au benzoate de sodium, au chlorure de sodium ou de calcium ont été expérimentés pour inhiber le développement de la flore indésirable pendant le maltage (Ogundiwin *et al.*, 1991; Lefyedi, 2006). De même, des méthodes biologiques par inoculation de cultures starter de bactéries lactiques et de levures dans l'eau de trempage, ont donné des résultats concluants quant au contrôle du développement de germes

indésirables pendant le maltage de l'orge et du sorgho (Boivin and Malanda, 1997; Lefyedi, 2006). Les espèces bactériennes utiles du malt contribuent favorablement à la technologie des produits fermentés à base de malt de céréales. Ainsi, *Lact. fermentum* a été identifié au cours de la fermentation naturelle de l'*ogi* et du *kunun-zaki*, produits fermentés à base de malt de sorgho ou de malt de mil (Olasupo *et al.*, 1997). Précédemment, *Lact. fermentum* a été décelée comme l'espèce dominante impliquée dans la fermentation naturelle du moût du dolo et du pito (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007). Les isolats de *Lact. fermentum* responsables de la fermentation du moût ont la capacité de produire des polysaccharides exocellulaires (EPSs) et des substances antimicrobiennes contre des germes pathogènes et certains isolats ont montré une faible activité amylasique (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2008). L'objectif du présent travail est d'identifier et de déterminer les propriétés technologiques des isolats dominants de bactéries lactiques associés au maltage du sorgho, pour la sélection de cultures starter.

## II.1 Matériel et Méthodes

### II.1.1 Site d'étude et échantillonnage

Le maltage traditionnel du sorgho a été étudié dans quatre sites à Ouagadougou (Burkina Faso) et à Tamale (Nord Ghana). Les deux sites de Tamale sont localisés à Tamale town et à Nyankpala, village situé à 20 Km à l'ouest de Tamale; ces sites appartiennent à deux femmes *dagarti* productrices de *pito*, qui produisent elles-mêmes le malt de sorgho pour le brassage du *pito*. Les sites de Ouagadougou sont localisés dans les quartiers Kalgondin et Saint Léon ; elles appartiennent à deux femmes *mossi* qui produisent le malt de sorgho pour vendre aux productrices de *dolo*. Les sites de maltage sont identifiés par les localités: Tamale town, Nyankpala, Kalgondin et Saint Léon.

Les procédés de maltage ont été suivis dans les différents sites ci-dessus décrits et un diagramme général de production de malt de sorgho a été établi. Des échantillons de matières premières, de produits intermédiaires et de produits finis ont été prélevés aux principales étapes de maltage du sorgho pour les analyses au laboratoire. Dans chaque site ou unité de maltage, trois séries d'échantillonnage ont été réalisées. A chaque échantillonnage, 200 g (ou 200 ml) d'échantillon ont été prélevés en double dans des bocaux à fermeture vissant préalablement stérilisés. Les échantillons ont été placés dans une glacière contenant de la glace puis transportés au laboratoire où ils ont été conservés à 4°C pour les analyses lesquelles ont été réalisées en moins de 24h.

### **II.1.2 Dénombrement microbien, isolement/purification et caractérisation phénotypique des isolats bactériens**

La technique de comptage de colonies sur milieu gélosé a été utilisée pour le dénombrement microbien. Les bactéries aérobies mésophiles ont été dénombrées sur la gélose Plate Count Agar (PCA) après un ensemencement en surface et une incubation à 37°C pendant 48h. Les bactéries lactiques ont été dénombrées sur la gélose de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) après un ensemencement dans la masse et une incubation à 37°C pendant 72h en anaérobiose (jarre d'anaérobiose, système Anaerocult A). Le milieu Malt Agar (MA) contenant par litre, 100 mg de chloramphénicol et 50 mg chlorotétracycline a été utilisé pour le dénombrement des levures et moisissures après incubation à 30°C pendant 72 heures. Les résultats sont exprimés en Unité Formant Colonie (UFC)/ml (ou /g)

L'isolement/purification et la caractérisation phénotypique des isolats dominants ont été réalisés selon la procédure précédemment décrite (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2009). Les isolats ont été caractérisés par la morphologie des colonies et des cellules par microscopie en contraste de phase, la réaction de Gram (Gregersen, 1978), la réaction de la catalase, la production de gaz à partir du glucose sur le milieu semi-solide de Gibson et Abdel-el-Malek (Guiraud, 1998), la croissance à 15°C et 45°C, la croissance à pH 9,2 et la croissance en présence de NaCl à 6,5%. Un total de 178 isolats présumés lactiques collectés dans les unités de maltage de Ouagadougou (72 isolats) et les deux sites de production de Tamale (106 isolats) ont été conservés à -20°C dans un mélange de bouillon MRS et de glycérol à 50% pour la caractérisation génotypique et l'identification.

### **II.1.3 Caractérisation génotypique et identification des isolats de bactéries lactiques**

Cette partie du travail a été réalisée à l'Université de Copenhague (Denmark) au « Department of Food Science, Food Microbiology ». L'approche polyphasique qui combine des méthodes phénotypiques et génotypiques a été utilisée.

- Les isolats collectés dans les deux sites de Tamale et couvrant les principales opérations du maltage (Fig.6) ont été caractérisés par le polymorphisme de restriction de la portion d'ADN correspondant à l'espace inter génique 16S-23S du gène codant pour l'ARNr ou Intergenic Transcribed Spacers - Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism (ITS-PCR/RFLP) ou simplement analyse du ITS-PCR/RFLP, réalisée selon la méthode utilisée par Lei et Jakobsen (2004). L'ADN a été extrait puis amplifié en utilisant Cy5-16S 1500F (5'-AAG TCG TAA CAA GGT A-3') et 23S-32R (5'-GCC ARG GCA TGG ACC-3') comme amorces. Les produits PCR ont été digérés avec l'endonucléase de restriction Taq<sup>q</sup>I. Les

fragments ITS-PCR et les fragments de restriction RFLP ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, visualisés sous des rayonnements UV puis photographiés. La position et l'intensité des fragments (ou bandes) ont été analysées par un programme informatisé Kodak ID Image Analysis software version 3.5 (VWR International Kodak ApS, Albertslund, Denmark). Les isolats ont été regroupés selon leurs profils ITS-PCR/RFLP, puis 30 isolats représentant les différents groupes ont été utilisés pour déterminer le profil de fermentation des hydrates de carbone à l'aide des kits API 50 CHL, puis les isolats ont été identifiés par présomption grâce au logiciel APILAB Plus version 3.3.3 (BioMerieux).

- L'identification effective des isolats a été faite par le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S selon la méthode utilisée par Lei et Jakobsen (2004). L'ADN a été extrait selon la procédure de Marmur (1961), puis amplifié en utilisant les amorces ou primers U968gc (5'-GAA CGC GAA CCT TAC-3') et L1401 (5'-GCG TGT GTA CAA GAC CCC-3'). Après purification, l'amplification de l'ADN purifié pour le séquençage a été faite avec les amorces 970 F (5'-GGA CGC GAA CCT TAC-3') et 1372 R (5'-CAG GCC CGG GAA CGT ATT CAC-3'). L'électrophorèse et le séquençage de l'ADN ont été réalisés avec le CEQ 2000 DNA Analysis system (Beckman Coulter, California USA). La séquence de l'ADN et l'identité des isolats ont été obtenues par la banque de données des gènes BLAST Gen database ([www.ncbi.nlm.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.gov/blast)).

Les 72 isolats collectés dans les deux unités de maltage de Ouagadougou ont été caractérisés par le profil de fermentation des hydrates de carbone avec les kits API 50 CHL, puis identifiés par présomption au niveau du genre en se référant aux isolats identifiés de Tamale.

#### **II.1.4 Détermination des propriétés technologiques des isolats de bactéries lactiques**

Les 106 isolats identifiés de Tamale (Ghana) ont été utilisés pour la recherche des activités antimicrobienne et amylasique et la production de polysaccharides exocellulaires (EPSs). Les méthodes, réactifs et milieux de culture décrits par Sawadogo-Lingani *et al.* (2008) ont été utilisés.

L'activité antimicrobienne des isolats a été recherchée par la technique des essais en touches (Schillinger et Lücke, 1989); les souches *Listeria innocua* ATTC 33090, *Staphylococcus aureus* entérotoxine A, *Staphylococcus aureus* entérotoxines A + B et *Escherichia coli*, de la collection du « Department of Food Science, Food Microbiology, University of Copenhagen », ont été utilisées comme indicateurs de germes pathogènes. La largeur de la zone d'inhibition a

été mesurée (en mm) de la bordure de la colonie de *Lact. fermentum* testée à la limite supérieure de la zone d'inhibition.

La production des EPSs par les isolats a été mise en évidence par la méthode décrite par Guiraud (1998), puis l'aspect onctueux et filant des colonies qui traduit la production de EPSs a été examiné par la technique à la anse (Knoshaug *et al.*, 2000). Les isolats EPSs-positifs ont été confirmés en les cultivant pendant 24h dans du bouillon MRS-saccharose (5% m/v) sans glucose ni peptone (Pidou *et al.*, 1990) ; le bouillon de culture a été ensuite centrifugé (5 000 g, 10 min, 4°C) et 1ml de surnageant a été transféré dans un tube à essai auquel on ajoute un volume égal d'éthanol à 95°C refroidi à 4°C. La présence de polysaccharides se traduit par la formation d'un anneau opaque à l'interface. Les isolats EPSs-positifs sont notés en fonction de l'intensité de l'anneau (++ : bonne production; + : assez bonne production; ± : faible production).

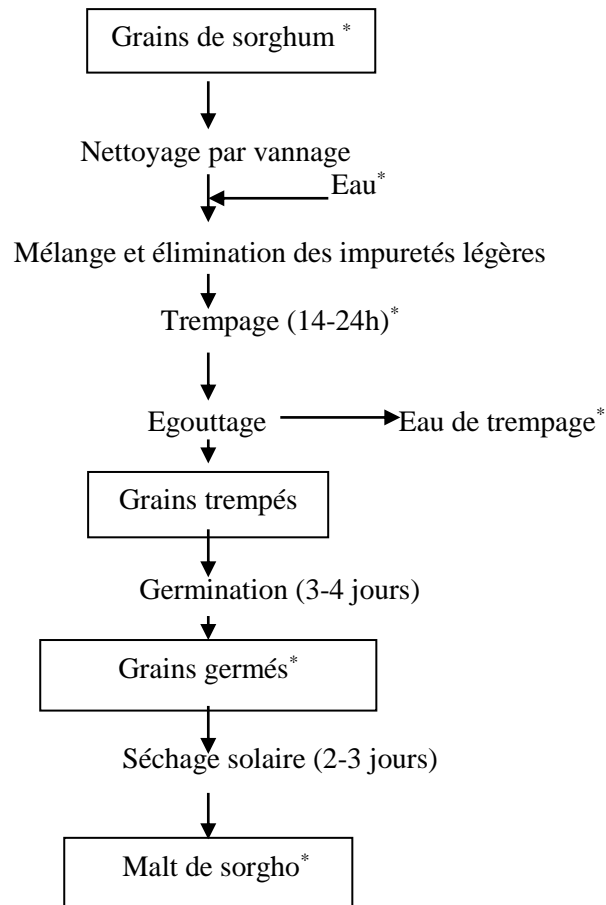
La capacité des isolats à produire des amylases a été déterminée selon la méthode décrite par Sanni *et al.* (2002) en cultivant les isolats sur la gélose MRS modifiée contenant l'amidon comme seul source de carbone. L'hydrolyse de l'amidon qui traduit la production d'amylase par les isolats est mise en évidence par la présence d'un halo clair entourant les colonies après pulvérisation avec une solution de Lugol [0,33 % (m/v) d'iode (Prolabo, Paris, France), 0,66 % (m/v) d'iodure de potassium (Labosi, Paris, France)]. La capacité des isolats à se développer sur la gélose MRS-amidon a également été notée comme une faible activité amylasique.

## II. 3 Résultats

### II.3.1 Le maltage traditionnel des grains de sorgho dans les sites étudiés

Les grains de sorgho utilisés comme matière première pour la production du malt de sorgho dans les sites étudiés ont été achetés au marché de la localité. Dans les unités de Ouagadougou, le sorgho rouge est utilisé comme matière première alors que dans les sites de Tamale c'est un mélange de sorgho rouge et de sorgho blanc (v : v) qui est utilisé comme matière première. La figure 6 présente le diagramme général de production du malt de sorgho dans les sites de Tamale et Ouagadougou. Les principales opérations du maltage traditionnel du sorgho sont: le nettoyage des grains par vannage, le trempage des grains dans l'eau, l'égouttage, la germination et le séchage solaire des grains germés. Les grains ont été immergés dans de l'eau contenue dans une jarre en argile cuite pendant une durée de 14 - 24 h selon les sites ; les grains ont été ensuite égouttés dans des paniers tressés, puis étendus en couche mince sur une terrasse cimentée ou une terrasse en terre battue, généralement située sous un hangar ; les grains ont été

recouverts de sacs en jute et laissés ainsi à germer pendant 3-4 jours, avec retournement et aspersion quotidiens d'eau. Les grains germés ont été séchés au soleil pendant 2-3 jours, ou pré-séchés pendant quelques heures et tassés dans des sacs en polyéthylène pendant 24 heures avant un séchage solaire de 2 jours.



**Figure 6** : Diagramme général de production du malt de sorgho à Ouagadougou (Burkina Faso) et à Tamale (Ghana)

### I.3.2 Evolution du pH et des microorganismes dominants durant le maltage des grains de sorgho

Les grains de sorgho utilisés comme matière première dans les quatre sites étudiés contenaient des bactéries lactiques, des bactéries aérobies mésophiles et des levures à des niveaux respectifs de  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^5$  cfu/g. Le trempage des grains s'est caractérisé par une diminution du pH de l'eau de trempage ( $5,08 \pm 0,22$  à  $4,20 \pm 0,50$  dans les sites de Tamale;  $5,30 \pm 0,15$  à  $3,90 \pm 0,21$  dans les sites de Ouagadougou) et une prolifération des microorganismes

(Tableaux Va & Vb, Annexe). Pendant le trempage, la charge de bactéries lactiques a considérablement augmenté dans l'eau de trempage, de l'ordre de  $10^5$  à  $10^{10}$  cfu/ml, alors que celle des bactéries aérobies mésophiles a augmenté de  $2,0 \times 10^6$  à  $6,4 \times 10^7$  cfu/ml dans les sites de Ouagadougou et de  $2,9 \times 10^7$  à  $4,0 \times 10^7$  cfu/ml à Tamale. La prolifération des bactéries aérobies a été principalement due à la croissance des bactéries Gram-positif, catalase-positif qu'à celle des bactéries Gram-négatif, catalase-positif (Tableaux Va & Vb, Annexe). La charge microbienne de l'eau utilisée pour le trempage des grains a été de l'ordre de  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^3$  cfu/ml respectivement pour les bactéries lactiques, les bactéries aérobies totales et les levures. Les grains germés et le malt de sorgho séché contenaient une charge élevée de bactéries lactiques ( $10^7$  et  $10^6$ - $10^7$  cfu/g respectivement), de bactéries aérobies mésophiles ( $10^6$  cfu / g) et de levures ( $10^4$  cfu/g et  $10^6$  cfu/g respectivement). Des moisissures ont été observées dans les grains de sorgho, au début du trempage, dans les grains germés et dans le malt séché.

### **II.3.3 Caractéristiques génotypiques et identification des isolats de bactéries lactiques**

Un total de 178 isolats Gram-positif, catalase-négative, non sporulants, immobiles, constitués de bacilles, de cocci, de coccobacilles ou de cocci formant des tétrades, ont été collectés dans les sites de Tamale (106 isolats) et de Ouagadougou (72 isolats). Ils sont constitués d'isolats hétérofermentaires produisant du  $\text{CO}_2$  à partir du glucose (70% des isolats de Tamale et 78% des isolats de Ouagadougou) et d'isolats homofermentaires ne produisant pas de  $\text{CO}_2$  à partir de glucose (30% des isolats de Tamale et 22% des isolats de Ouagadougou).

#### **II.3.3.1 Les profils ITS-PCR/RFLP des isolats de bactéries lactiques**

Le Tableau VI présente les résultats de l'analyse du ITS-PCR/RFLP de l'ADN des 106 isolats de Tamale ; ceux-ci montrent une répartition des isolats selon différents profils ITS-PCR, notamment les profils A (46 isolats), B (16 isolats), H (26 isolats) et I (12 isolats). Le profil O a regroupé les isolats présentant des profils différents des précédents. Les profils A et B présentent des similarités. Après l'action de l'endonucléase de restriction  $\text{Taq}^{\alpha}\text{I}$ , les isolats qui ont présenté les profils ITS-PCR A, ont donné les profils RFLP a ou c; les isolats de profil B ont donné le profil RFLP a ou d ; les isolats de profil H ont donné le profil RFLP h et ceux de profil I ont donné le profil RFLP i (Tableau VI).

**Tableau VI: Caractéristiques des produits ITS-PCR/RFLP de 106 isolats de bactéries lactiques provenant des sites de maltage du sorgho de Nyankpala et Tamale town**

Produits ITS-PCR		Produits RFLP		Nombre d'isolats		
Profil	Dimension / taille des fragments ou bandes en pair de bases (bp)	Profil	Dimension / taille des fragments ou bandes en pair de bases (en bp)	Total	Nyankpala	Tamale town
A (5 bandes)	756±25; 539 ±14; 473±13; 406±11; 289±8	a (28 isolats)	387±21; 332±10; 210±11; 134±10; 98±11	46	24	22
		c (18 isolats)	332±10; 210±11; 134±10; 98±11			
B (4 bandes)	756±25; 473±13; 406 ±11; 289±8	a (12 isolats)	387±21; 332±10; 210±11; 134±10; 98±11	16	10	6
		d (4 isolats)	210±11; 134±10; 98±11			
H (3 bandes)	510±11; 439±9; 315±8	h	404±11; 320±9; 249±9; 194±6; 91±12	26	12	14
I (3 bandes)	532±11, 448±9; 335±10	i	334±18; 262±19; 194±10; 138±11; 77±8	12	7	5
O (autres)	nd	nd	nd	6	4	2

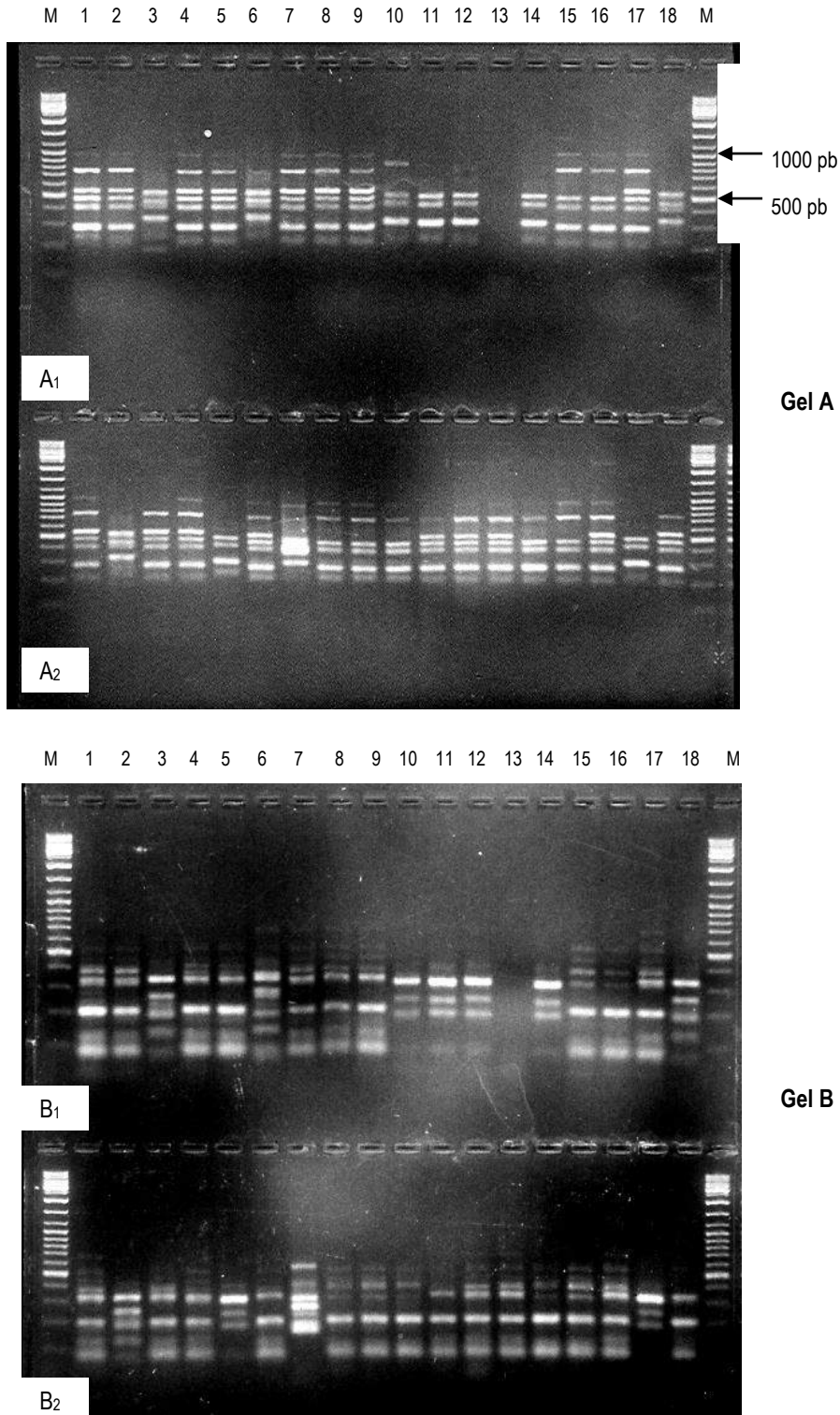
nd: non déterminé

**Tableau VII: Identification de 106 isolats de bactéries lactiques provenant des sites de maltage du sorgho de Nyankpala et Tamale town**

Profils ITS-PCR/RFLP	Tentative d'identification par les kits API 50 CHL et le logiciel APILAB Plus version 3.3.3	Identification par le séquençage du gène codant pour l'ARN r 16S		% d'isolats
		Identités	% de similarité	
A/a	<i>Lact. brevis</i> avec 99, 9%ID (7 isolats)*	<i>Lact. fermentum</i> (N3a6)**	99,5	58,49
A/c	<i>Lact. brevis</i> avec 95, 5%ID (5 isolats)	<i>Lact. fermentum</i> (N3a9)	99,0	
B/a	<i>Lact. brevis</i> avec 99,6%ID (5 isolats)	<i>Lact. fermentum</i> (Nsb2)	99,0	
B/d	<i>Lact. cellobiosus</i> avec 96 %ID (2 isolats)	<i>Lact. fermentum</i> (Nsb8)	99,2	
H/h	<i>Ped. pentosaceus</i> avec 98%ID (6 isolats)	<i>Ped. acidilactici</i> (N1a5)	99,3	22,64
		<i>Ped. acidilactici</i> (Npo8)	99,0	
		<i>Ped. pentosaceus</i> (N2a17)	99,5	
I/i	<i>Lact. coprophilus</i> avec 98,8%ID (4 isolats)	<i>Weissella confusa</i> (N1a4)	99,7	11,32
		<i>Weissella confusa</i> (N2a8)	99,7	
O	<i>Lact. acidophilus</i> avec 89,5%ID (1 isolats)	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> (N2a2)	95,7	1,88
	<i>Lactococcus lactis</i> avec 58,3% ID (2 isolats)	<i>Enterococcus faecium</i> (N2a18')	99,5	3,77

\*: entre parenthèses, nombre d'isolats utilisés pour l'identification avec les kits API CHL ; \*\*: entre parenthèse, références des isolats utilisés pour le séquençage





**Fig.7: Gels d'agarose des produits ITS-PCR / RFLP** d'espèces dominantes de bactéries lactiques isolées du maltage traditionnel du sorgho à Tamale (Ghana). **Gel A: Profils ITS-PCR** des isolats de *Lact. fermentum* (A<sub>1</sub>: lignes 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 15, 16 et 17; A<sub>2</sub> lignes 1, 3, 4, 6, 11, 12, 13, 8, 9, 10, 14, 15, 16 et 18); *Ped. acidilactici* (A<sub>1</sub>: lignes 10, 11, 12 et 14; A<sub>2</sub>: ligne 17); *Ped. pentosaceus* (A<sub>2</sub>: ligne 5); *W. confusa* (A<sub>1</sub>: lignes 3, 6 et 18; A<sub>2</sub>: ligne 2); *Lactococcus lactis* (A<sub>1</sub>: ligne 13) et *Enterococcus faecium* (A<sub>2</sub>: ligne 7). **Gel B: Profils RFLP** des mêmes isolats dans le même ordre. *Lact. fermentum* (B<sub>1</sub>: lignes 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 15, 16 et 17; B<sub>2</sub>: lignes 1, 3, 4, 6, 11, 12, 13, 8, 9, 10, 14, 15, 16 et 18); *Ped. acidilactici* (B<sub>1</sub>: lignes 10, 11, 12 et 14; B<sub>2</sub>: lignes 5 et 17); *W. confusa* (B<sub>1</sub>: lignes 3, 6 et 18; B<sub>2</sub>: ligne 2); *Lactococcus lactis* (B<sub>1</sub>: ligne 13) et *Enterococcus faecium* (B<sub>2</sub>: ligne 7). M: DNA size marker (GeneRuler DNA ladder mix).

### II.3.3.2 Les espèces dominantes de bactéries lactiques identifiées

L'identification par présomption avec les kits API 50 CHL a donné les résultats suivants : les isolats de profils ITS-PCR/RFLP A/a, A/c et B/a ont été identifiés comme *Lact. brevis*, et ceux de profil B/b comme *Lact. cellubiosus*; les isolats de profil ITS-PCR/RFLP H/h ont été identifiés comme *Ped. pentosaceus* et ceux de profil I/i comme *Lact. coprophilus* (Tableau VII).

Le séquençage partiel du gène codant pour l'ARNr 16S (portion 968-1401) a montré que tous les isolats de profils ITS-PCR/RFLP A/a, A/c, B/a et B/d se sont référés à *Lact. fermentum* avec 99,5%, 99,2% et 99,0 % degré de similarité (Tableau VII); ce sont des bacilles, produisant du gaz à partir du glucose, se développant à 45°C et plus ou moins à 15°C. Les isolats de profil H/h ont été référés à *Ped. acidilactici* avec 99,3% et 99,0% de degré de similarité (Tableau VII); deux des isolats ont été référés à *Ped. pentosaceus* avec 99,5% de degré de similarité; les cellules sont des cocci formant des tétrades, ne produisant pas de gaz à partir du glucose, se développant à 15°C et à 45°C. Les isolats de profil ITS-PCR/RFLP I/i se sont référés à *Weissella confusa* avec 99,7% de degré de similarité (Tableau VII); ce sont des coccobacilles, isolés, en paires et en courtes chaînes de 3-4 unités, produisant du gaz à partir du glucose et se développant à 15°C et à 45°C. Le reste des isolats a été identifié par séquençage à *Enterococcus faecium* avec 99,5% de degré de similarité (4 isolats) et *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* avec 95,7% de degré de similarité (2 isolats). Les cellules des isolats identifiés comme *Enterococcus faecium* sont des cocci en paire et courtes chaînes, ne produisant pas de gaz à partir du glucose et se développant à 15°C et 45°C, dans du bouillon MRS contenant NaCl à 6,5% et dans du bouillon MRS à pH 9,2; les isolats de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* sont des cellules ovoïdes en paire et en chaîne, ne produisant pas de gaz à partir du glucose, se développant à 15°C mais pas à 45°C, se développant dans du bouillon MRS à pH 9,2 mais pas dans le bouillon MRS contenant du NaCl à 6,5%. Les profils ITS-PCR/RFLP des espèces dominantes identifiées sont illustrés par la figure 7.

Les espèces prédominantes de bactéries lactiques associées au maltage traditionnel du sorgho pour la production du *pito* dans les sites de Tamale (Nord Ghana) sont *Lact. fermentum* (58,49% des isolats), *Ped. acidilactici* (22,64%), *Ped. pentosaceus* (1,88%), *Weissella confusa* (11,32%), *Enterococcus faecium* (3,77%), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (1,88%) (Tableau VII).

Les isolats collectés des deux sites de maltage de Ouagadougou n'ont pas été identifiés par le séquençage de gène codant pour l'ARNr 16S. Ils ont été regroupés sur la base de caractéristiques phénotypiques, notamment la morphologie des colonies et des cellules, la production de gaz à partir du glucose, la croissance à 15°C et à 45°C, la croissance dans du bouillon MRS à pH 9,2 et dans du

bouillon MRS contenant 6,5% de NaCl et les profils de fermentation des hydrates de carbone. Ils ont été identifiés par présomption à l'aide des résultats API 50 CHL. A l'échelle du genre, la composition des isolats de Ouagadougou apparait similaire à celle de Tamale et seraient composés de *Lactobacillus* spp. (55%), *Pediococcus* spp. (23%), *Weissella* spp. (9,5%), *Enterococcus* spp. (5,6%), *Lactococcus* spp. (4,5%) et d'isolats non identifiés.

### II.3.4 Profils de fermentation des hydrates de carbone des espèces identifiées

Les isolats de *Lact. fermentum*, *Ped. acidilactici* et *W. confusa* ont montré la capacité de fermenter le glucose, le fructose, le galactose et le D-mannose mais pas l'amidon.

En plus de ces sucres, les isolats de *Lact. fermentum* ont fermenté la L-arabinose, le ribose, le mélibiose, le saccharose et le gluconate; le maltose, le D-raffinose et le 5-cetogluconate ont été fermentés par 94% des isolats; 88% ont fermenté le D-xylose et 70% le lactose; le cellobiose, l'esculine, le tréhalose, le  $\beta$ -gentiobiose, la salicine et l'amygdaline ont été fermentés par 47% des isolats de *Lact. fermentum*; certains isolats ont fermenté le tréhalose (41%), l'arbutine (39%), le tagatose (35%) et le mannitol (12%).

Pour ce qui concerne *Ped. acidilactici*, en plus des sucres précédemment cités, les isolats ont montré la capacité de fermenter d'autres sucres comme le cellobiose, le  $\beta$ -gentiobiose et le tagatose; 80% ont fermenté le ribose, le tréhalose et la L-arabinose; le gluconate et le mannitol ont été fermentés par 40% des isolats ; 20% ont fermenté le glycérol, le maltose, le lactose et le saccharose.

Les isolats de *Ped. pentosaceus* ont montré la capacité de fermenter les sucres précédents fermentés par *Ped. acidilactici* à l'exception du mannitol et du glycérol. En plus, ils ont pu fermenter le D-xylose, le melibiose, le D-raffinose et l'amidon.

Les isolats de *W. confusa* ont fermenté le ribose, le D-xylose, le cellobiose, le maltose, le mélibiose, le saccharose, le  $\beta$ -gentiobiose et le gluconate; 50% des isolats ont fermenté d'autres sucres par exemple la L-arabinose, le lactose, le tréhalose et le raffinose.

Les isolats de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* ont été capables de fermenter le galactose, le glucose, le fructose, le D-mannose, l'esculine, le maltose, le lactose et le saccharose. Quant aux isolats de *Enterococcus faecium*, ils ont été capables de fermenter le galactose, le glucose, le fructose, le D-mannose, l'esculine, le maltose, le lactose, le saccharose, L-arabinose, le ribose, le rhamnose, le cellobiose, le mélibiose, le tréhalose, l'amidon et le  $\beta$ -gentiobiose (Tableau VIII, Annexe).

### II.3.5 Distribution des espèces identifiées selon les sites et les étapes du procédé de maltage

Comme le montre le Tableau IX, au cours du procédé de maltage du sorgho dans les sites de Tamale town et Nyankpala, *Lact. fermentum* a été l'espèce prédominante dans les grains de sorgho (42,8 - 56,2% des isolats collectés à cette étape), au début (54,5 - 55,5% des isolats) et en fin (61,5 - 66,7% des isolats) de trempage des grains et dans le malt séché (66,7 - 70% des isolats). *Ped. acidilactici* représente la deuxième espèce prédominante identifiée (11,1 à 30,0% des isolats selon les étapes). *W. confusa* est également une des espèces prédominantes identifiées dans les grains de sorgho (14,3 - 18,7% des isolats collectés à cette étape), du début (9,1 - 16,2% des isolats) en fin (8,3 - 15,4% des isolats) de trempage des grains, mais non identifiée dans le malt séché. Dans les deux sites de production, *Lact. fermentum*, *Ped. acidilactici* et *W. confusa* ont été impliquées dans la fermentation lactique naturelle non contrôlée observée pendant le trempage des grains et leur charge dans l'eau de trempage a augmenté de  $10^4$ - $10^5$  à  $10^9$ - $10^{10}$  cfu/ml (Tableau IX). *Lactococcus lactis* ssp.*lactis* et *Enterococcus faecium* ont été identifiés parfois dans les grains de sorgho, dans l'eau au début du trempage ou dans le malt séché (Tableau IX). Il ressort de ces résultats que *Lact. fermentum* et *Ped. acidilactici* identifiés dans le malt de sorgho, ont pour principale origine les grains de sorgho utilisés comme matière première.

### II.3.6 Propriétés technologiques des isolats de bactéries lactiques

#### II.3.6.1 L'activité antimicrobienne des isolats

Les 106 isolats de Tamale ont été examinés par la technique des essais en touches et une activité antimicrobienne a été détectée pour 39,62%, 22,64% et 17,92% des isolats envers respectivement *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *L. innocua* ; les largeurs des zones d'inhibition ont varié de 6 à 20 mm pour *Staph. aureus* et de 1 à 5 mm pour *E. coli* et *L. innocua* (Tableau X). Les isolats qui ont inhibé la croissance de *S. aureus* appartiennent aux espèces *Lact. fermentum* (35 isolats), *W. confusa* (6 isolats) et *Ped. pentosaceus* (1 isolat). Aucun isolat de *W. confusa* et de *Pediococcus* spp. n'a inhibé la croissance de *E. coli* et *L. innocua*. 17,92 % des isolats ont inhibé la croissance des quatre souches indicatrices avec des zones d'inhibition variant de 1 à 20 mm. Aucune activité antimicrobienne n'a été décelée pour les isolats de *Ped. acidilactici*, *Lactococcus lactis* et *Enterococcus faecium* envers les quatre souches indicatrices utilisées.

**Tableau IX : Distribution (% d'isolats) des espèces prédominantes de bactéries lactiques dans les sites de maltage du sorgho à Nyankpala (N) et Tamale town (Tt); entre parenthèse, la charge bactérienne en ufc/ml (ou g).**

Echantillons/ Etapes de production	Site de maltage de Nyankpala					
	<i>Lact. fermentum</i>	<i>Ped. acidilactici</i>	<i>Ped. pentosaceus</i>	<i>Weissella confusa</i>	<i>Lactococcus lactis ssp.lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
Grains de Sorgho	56,2 (4,4 x10 <sup>5</sup> )	18,7 (1,5 x10 <sup>5</sup> )	-	18,7 (1,5 x10 <sup>5</sup> )	-	6,2 (4,9 x10 <sup>4</sup> )
Eau de trempage au début du trempage des grains	55,5 (4,3 x10 <sup>5</sup> )	11,1 (8,6 x10 <sup>4</sup> )	5,5 (4,3 x10 <sup>4</sup> )	16,2 (1,3 x10 <sup>5</sup> )	5,5 (4,3 x10 <sup>4</sup> )	5,5 (4,3 x10 <sup>4</sup> )
Eau de trempage en fin de trempage des grains	66,7 (2,8 x10 <sup>10</sup> )	25,0 (8,2 10 <sup>9</sup> )	-	8,3 (3,5 x10 <sup>9</sup> )	-	-
Malt de sorgho en fin de séchage solaire	70,0 (9,1 x10 <sup>6</sup> )	30,0 (3,9 x10 <sup>6</sup> )	-	-	-	-
Site de maltage de Tamale town						
Grains de sorgho	42,8 (3,4 x10 <sup>5</sup> )	28,6 (2,2 x10 <sup>5</sup> )	7,1 (5,6 x10 <sup>4</sup> )	14,3 (1,1 x10 <sup>5</sup> )	-	7,1 (5,6 x10 <sup>4</sup> )
Eau de trempage au début du trempage des grains	54,5 (4,2 x10 <sup>5</sup> )	27,3 (2,1 x10 <sup>5</sup> )	-	9,1 (7,1 x10 <sup>4</sup> )	9,1 (7,1 x10 <sup>4</sup> )	-
Eau de trempage en fin de trempage des grains	61,5 (2,6x10 <sup>10</sup> )	23,1 (9,6 x10 <sup>9</sup> )	-	15,4 (6,4 x10 <sup>9</sup> )	-	-
Malt de sorgho en fin de séchage solaire	66,7 (8,6 x10 <sup>6</sup> )	25,0 (3,2 x10 <sup>6</sup> )	-	-	-	8,3 (1,1 x10 <sup>6</sup> )

-: non détecté parmi les isolats

**Tableau X: Activité antimicrobienne de 106 isolats de bactéries lactiques associés au maltage traditionnel du sorgho à Tamale (Nord Ghana)**

Souches indicatrices de germes pathogènes	Spectre d'inhibition des isolats de bactéries lactiques (n = 106)					% d'isolats ayant une activité antimicrobienne
	<i>Lact. fermentum</i>	<i>Wesseilla confusa</i>	<i>Pediococcus spp.</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>Staph. aureus</i> / Entérotoxine A	-(27) ++(12) +++ (14) ++++(9)	-(6) +++ (3) ++++(3)	-(25) +++ (1)	-(2)	-(4)	39,62% (42/106)
<i>Staph. aureus</i> / Entérotoxines A et B	-(27) ++(18) +++ (12) ++++(5)	-(6) +++ (6)	-(25) +++ (1)	-(2)	-(4)	39,62% (41/106)
<i>E. coli</i>	-(38) +(24)	-(12)	-(26)	-(2)	-(4)	22,64% (24/106)
<i>L. innocua</i> ATTC 33090	-(43) +(19)	-(12)	-(26)	-(2)	-(4)	17,92% (19/106)

-: aucune activité; +: activité positive avec des zones d'inhibition de 1 à 5 mm de large; ++: activité positive avec des zones

d'inhibition de 6 à 10 mm de large; +++: activité positive avec des zones d'inhibition de 11 à 15 mm de large;

++++: activité positive avec des zones d'inhibition de 16 à 20 mm de large ; entre parenthèses, nombre d'isolats.

### II.3.6.2 L'activité amylasique des isolats

Le screening des 106 isolats de Tamale pour la recherche de l'activité amylasique a montré que 37,73% des isolats soit au total 40 isolats, composés d'isolats de *Lact. fermentum* (34), *Ped. acidilactici* (2), *Ped. pentosaceus* (1), *W. confusa* (2) et *Enterococcus faecium* (1) ont été capables de se développer sur la gélose MRS modifiée contenant l'amidon comme seule source de carbone. La croissance des isolats sur la gélose MRS-amidon traduit leur capacité à utiliser l'amidon mais avec une faible activité amylasique, bien qu'un halo clair entourant les colonies testées n'ait pas été mis en évidence comme la souche de contrôle positif qui a montré un halo de 2 mm.

### II.3.6.3 La capacité des isolats à produire des polysaccharides exocellulaires (EPSs)

Le screening des 106 isolats quant à leur capacité à produire des polysaccharides exocellulaires a révélé que 90,5% des isolats ont la capacité de produire des EPSs. 77,3% des isolats (82) ont révélé une assez bonne production d'EPSs et composés de 59 isolats de *Lact. fermentum*, 13 isolats de *Ped. acidilactici*, 6 isolats de *W. confusa*, 2 isolats de *Ped. pentosaceus* et 2 isolats de *Lactococcus lactis*.

13,2% des isolats appartenant aux espèces *Lact. fermentum* (3 isolats), *Ped. acidilactici* (7 isolats) et *W. confusa* (4 isolats) ont révélé une faible production d'EPSs.

## II.4 Discussion

La production du malt de sorgho dans les sites étudiés est faite à l'échelle familiale avec des ustensiles et équipements rudimentaires dans des conditions environnementales non contrôlées. Le développement de la flore lactique et l'abaissement simultané du pH observés pendant le trempage des grains de sorgho, résultent d'une fermentation lactique naturelle non contrôlée et corroborent certains résultats antérieurs sur le trempage des grains de céréales en vue du maltage ou de la production de produits fermentés (Odunfa et Adeyele, 1985; Kelly et Briggs, 1992; Booyesen *et al.*, 2002; Lei et Jakobsen, 2004). La prédominance des bactéries lactiques dans le malt de sorgho est due au fait que ces bactéries, déjà présentes en nombre important dans les grains de sorgho (matière première), ont proliféré pendant le trempage, ce qui a donné un avantage quant à leur dominance dans le malt final. En examinant la succession des principaux groupes microbiens de la matière première au malt séché, il ressort que les grains de sorgho constituent la principale source des bactéries lactiques retrouvées dans le malt de sorgho, bien que l'eau, le matériel et l'environnement soient également des sources de contamination microbienne. De ce point de vue, Chavan et Kadam (1989) ont indiqué que les bactéries responsables de la fermentation naturelle des céréales, étaient principalement constituées de la flore originelle des grains, et ceci est valable pour le sorgho. Des bactéries du genre *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Pediococcus* ont généralement été identifiées comme espèces prédominantes associées au trempage des grains de céréales en vue de la production de malt ou de produits céréaliers fermentés (Odunfa et Adeyele; 1985; Ilori *et al.*, 1991; Ogundiwin *et al.*, 1991; Lei et Jakobsen, 2004 ; Booyesen *et al.*, 2002). *Lact. fermentum*, *W. confusa* et *Ped. acidilactici* ont été identifiées espèces dominantes responsables de la fermentation du *gowé*, un produit à base de malt de sorgho (Vieira-Dalodé *et al.*, 2007). *Lact. fermentum* a également été l'espèce dominante depuis le malt de sorgho jusqu' à la fermentation naturelle du moût du *dolo* et du *pito*, associée à *Lact. delbrueckii*, *Ped. acidilactici*, *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc lactis* (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007).

Les isolats de *Lact. fermentum* étudiés au cours de la présente étude ont la capacité de fermenter plus d'hydrates de carbone par rapport aux caractéristiques de l'espèce décrites par Hammes *et al.* (1992) et Seseña *et al.* (2004). De même, 12% à 47% des isolats associés au maltage

du sorgho ont la capacité de fermenter le mannitol, le D-tagatose, l'arbutine et la salicine, contrairement aux isolats impliqués dans la fermentation du moût du *dolo* et du *pito* (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007). Le profil de fermentation des sucres de la plupart des isolats de *Ped. acidilactici* corrobore des résultats précédents (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007 ; Simpson et Taguchi, 1995); quelques isolats ont cependant la capacité de fermenter d'autres sucres comme le N-acetylglucosamine, le maltose et le gluconate. Les isolats de *W. confusa* bien que répondant aux principales caractéristiques fermentaires décrites par Euzéby (2004), ont la capacité de fermenter d'autres sucres tels que le mélibiose, le L-arabinose, le raffinose et le tréhalose. Une diversité est mise en évidence au niveau des isolats d'une même espèce quant à leur capacité à fermenter les sucres. Cette observation rejoint celle de Lei et Jakobsen (2004) qui ont également trouvé une grande biodiversité des isolats de bactéries lactiques isolées du *koko*, par l'analyse des profils API 50 CHL.

La présente étude a mis également en évidence une divergence entre l'identification par les kits API 50 CHL et le logiciel APILAB plus, et celle par le séquençage partiel de l'ADN ; ceci montre que l'analyse par les kits API comme seule méthode n'est pas toujours fiable pour l'identification des bactéries lactiques comme l'ont déjà souligné d'autres auteurs (Nigatu, 2000; Paludan-Müller *et al.*, 2002; Lei et Jakobsen, 2004). Dans cet optique, Stiles et Holzapfel (1997) rapportaient que l'identification des bactéries lactiques était initialement basée sur les caractéristiques biochimiques et physiologiques, mais plusieurs travaux ont montré que cette approche seule n'était pas fiable, bien que certaines caractéristiques physiologiques soient exploitées pour différencier certaines espèces. D'autre part, *Lact. fermentum* et *Lact. brevis* sont des lactobacillus hétérofermentaires obligatoires (Novel, 1993; Hammes and Vogel, 1995) et certains isolats peuvent présenter des caractéristiques physiologiques similaires. Il a été également révélé par l'hybridation ADN-ADN que *Lact. cellobiosus* est identique à *Lact. fermentum* (Vescovo *et al.* 1979) et depuis, la première dénomination est considérée comme synonyme du second. De nos jours, l'approche polyphasique qui tient compte à la fois des caractéristiques phénotypiques et génotypiques est utilisée pour l'identification des bactéries (Vandamme *et al.*, 1996; Ehrmann and Vogel, 2005). Les kits API 50 CHL fournissent des données sur le profil de fermentation des hydrates de carbone des isolats, lesquelles sont intéressantes au plan technologique.

Simultanément à la baisse du pH et au développement des espèces dominantes *Lact. fermentum*, *Ped. acidilactici* et *W. confusa* pendant le trempage des grains de sorgho, le développement des bactéries Gram-négatif a été inhibé, comme l'ont démontré des travaux antérieurs utilisant des cultures starter de bactéries lactiques pour le contrôle de la croissance de la



flore indésirable au cours du maltage de l'orge ou du sorgho (Haikara et Laitila, 1995; Boivin et Malanda, 1997; Lefyedi, 2006). Dans de tel procédé, la fermentation lactique inhibe la croissance des germes pathogènes et d'altération par divers mécanismes comme la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, de substances antimicrobiennes, ou en abaissant le pH et le potentiel d'oxydo-réduction à un niveau tel que les microorganismes indésirables ne peuvent plus se développer (Mbugua et Njenga, 1992; Kingamko *et al.*, 1994; Tanasupawat et Komagata, 1995). Dans les pays en développement comme le Burkina Faso, l'utilisation des cultures starter et l'application des bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène devraient permettre d'améliorer la qualité bactériologique des malts de céréales destinés aux divers usages.

Les propriétés technologiques c'est-à-dire l'activité antimicrobienne, la production de polysaccharides exocellulaires et l'activité amylasique des isolats de *Lact. fermentum* associés au maltage du sorgho, sont comparables à celles des isolats de la même espèce impliqués dans la fermentation naturelle du moût produit à partir de malt de sorgho (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2008). Ce qui démontre que les isolats dominants identifiés dans le malt de sorgho proviennent des grains de sorgho utilisés comme matière première.

*Lact. fermentum* semble bien adapté au substrat et à l'environnement de production du malt de sorgho, du *dolo* et *pito*. *Lact. fermentum* constitue donc un candidat potentiel pour la sélection de cultures starter à utiliser depuis l'étape initiale de maltage c'est-à-dire le trempage des grains et pourrait contribuer à améliorer la qualité sanitaire du malt puis diriger ultérieurement la fermentation des produits à base de malt de sorgho au cours du procédé de production. La contribution attendue des cultures starter sera d'assurer la sécurité sanitaire des produits et de diriger la fermentation en inhibant la croissance des microorganismes indésirables pendant le maltage et la production du *dolo* et du *pito*.

**CHAPITRE III**

**IDENTIFICATION ET ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES BACTERIES  
LACTIQUES DOMINANTES IMPLIQUEES DANS LE BRASSAGE  
TRADITIONNEL DU *DOLO* ET DU *PITO***

## Résumé :

Le *dolo* et le *pito* sont deux boissons traditionnelles fermentées similaires produites à partir du malt de sorgho. Le procédé de brassage traditionnel du *dolo* et du *pito* a été étudié dans quatre sites de production à Ouagadougou (Burkina Faso) et à Tamale (Nord Ghana). Des échantillons ont été prélevés tout au long du processus de fabrication depuis la matière première jusqu'au produit fini pour les analyses physico-chimiques et microbiologiques. Les isolats dominants de bactéries lactiques ont été collectés, identifiés puis leur biodiversité a été examinée. Le broyage du malt de sorgho, l'empâtage, l'acidification du moût, la cuisson/concentration du moût acidifié, le refroidissement/décantation et la fermentation alcoolique du moût final après addition de la levure locale, ont constitué les principales étapes du brassage du *dolo* et du *pito*. Le dénombrement de bactéries lactiques dans la farine de malt de sorgho et dans les échantillons prélevés pendant l'empâtage, ont donné des valeurs de 5,6-7,5 log ufc/g ; des niveaux similaires de levures et de bactéries Gram-négatif, catalase-positives ont été observées dans les mêmes échantillons. Ces charges microbiennes ont diminué à des niveaux de 3,7-4,5 log ufc/g pour les bactéries lactiques et  $\leq 2-3$  log ufc/g pour les bactéries Gram-négatif, catalase-positives à la fin de l'empâtage qui est marquée par un traitement thermique modéré. Après l'acidification à la température ambiante qui a duré 12-16 h selon les sites, un développement bactérien est observé et le nombre de bactéries lactiques dans les échantillons acidifiés a atteint 8,8-9,9 log ufc/g; simultanément, le pH a diminué de  $5,55 \pm 0,12$  à  $3,72 \pm 0,24$  et l'acidité titrable a augmenté de 0,13 % à 0,61% acide lactique; les bactéries Gram-négatif, catalase-positives et les levures observées dans le malt de sorgho et durant l'empâtage n'ont plus été détectées. Au total 556 isolats de bactéries lactiques ont été collectés et identifiés par l'approche polyphasique basée sur des caractéristiques phénotypiques et génotypiques notamment le profil de fermentation des hydrates de carbone déterminé par les kits API 50 CHL, le profil ITS-PCR/RFLP de l'ADN, le profil PFGE de l'ADN et le séquençage partiel de l'ADN. *Lactobacillus fermentum* a été l'espèce dominante dans la farine de malt et les échantillons prélevés pendant l'empâtage et l'acidification. *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lact. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Pediococcus acidilactici* ont été les autres espèces impliquées dans l'acidification du moût ; toutefois ces espèces ont constitué une faible proportion de la population bactérienne et aucune succession distincte d'espèces n'a été observée. Les profils des espèces bactériennes ont été similaires pour les quatre sites étudiés; cependant, une diversité prononcée a été observée au niveau des isolats d'une même espèce sur la base des profils ITS-PCR/RFLP et PFGE.

*Lact. fermentum* a dominé toutes les étapes de la production du moût de *dolo* et de *pito*, notamment l'acidification avec une grande diversité génétique au niveau des isolats. Cette étude fournit pour une première fois, des précisions sur l'implication réelle des bactéries lactiques dans la production du moût du *dolo* et du *pito*. *Lact. fermentum* est responsable de l'acidification qui est une fermentation lactique. *Lact. fermentum* apparaît comme un candidat potentiel pour la sélection de culture starter en vue d'une fermentation contrôlée du moût. La sélection des isolats devra tenir cependant compte de la biodiversité et se faire sur la base des propriétés technologiques de ceux-ci.

**Mots clés:** malt de sorgho, bière traditionnelle, moût du *dolo* et du *pito*, acidification, *Lactobacillus fermentum*, biodiversité.

L'essentiel des résultats a été publié dans la revue *Journal of Applied Microbiology*.

## Introduction

Le *dolo* et le *pito* sont deux boissons fermentées Ouest Africaines produites à partir du malt de sorgho (*Sorghum bicolor* (L) Moench, *Sorghum vulgare*). Le *pito* est l'appellation commune de la bière de sorgho au Ghana, au Togo et au Nigeria (Ekundayo, 1969; Demuyakor et Ohta, 1991; Sanni et Lonner, 1993), alors que le *dolo* est l'appellation commune au Burkina Faso, en Côte d'Ivoire et au Mali (Konlani *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 1995; Kayode *et al.*, 2004). Au Ghana, le brassage du *pito* est traditionnellement associé au peuple de la région Nord du Ghana. Au Burkina, le *dolo* est produit sur toute l'étendue du territoire. Les travaux antérieurs sur la microbiologie du *dolo* et du *pito* ont surtout porté sur la fermentation alcoolique et l'identification des levures impliquées (Sefa-Dedeh et Asante, 1988; Demuyakor et Ohta, 1991; Konlani *et al.*, 1996; Sefa-Dedeh *et al.*, 1999; van der Aa Kühle *et al.*, 2001; Glover *et al.*, 2005). Certains auteurs ont cependant évoqué une fermentation mixte dans la production de la bière traditionnelle Sud Africaine, associant levures et bactéries lactiques (Novellie et De Schaepdrijver, 1986; Haggblade et Holzapfel, 1989; Steinkraus, 1996). *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus* ont été identifiés dans le *chibuku*, une bière traditionnelle du Zimbabwe (Togo *et al.*, 2002). A notre connaissance, aucune investigation détaillée n'a été réalisée sur l'implication des bactéries lactiques dans la production du moût du *dolo* et du *pito* par le brassage traditionnel, d'où l'objectif de la présente étude.

## III.1 Matériel et Méthodes

### III.1.1 Sites et matériel d'étude

Le travail a porté sur des isolats de bactéries lactiques collectés à partir d'échantillons de matières premières, de produits intermédiaires et de produits finis (*dolo*, *pito*) prélevés à différentes étapes de la production de *dolo* et de *pito*, respectivement au Burkina Faso et au Ghana.

#### III.1.1.1 Suivi du brassage traditionnel du *dolo* et du *pito*

Le procédé de brassage du *dolo* a été étudié dans quatre (4) sites de production au Burkina Faso, dont trois (3) sites à Ouagadougou et un (1) site à Gaoua. Les sites de Ouagadougou sont localisés dans les quartiers Samandin, Zone1 et Wayalguin ; le *dolo* y est produit par des femmes de l'ethnie *Mossi* (procédé *Mossi*). Le site de Gaoua est la propriété d'un groupement de femmes de l'ethnie *Daraga* (procédé *Dagara*).

Le brassage du *pito* a été étudié dans deux sites de production à Tamale dans le Nord Ghana, avec des productrices de l'ethnie *Dagarti* (procédé *Dagarti*). Ces sites de production sont localisés à Tamale town et à Nyankpala, village situé à 20 Km à l'Ouest de Tamale.

Trois suivis de production ont été réalisés à différentes périodes dans chacun des sites étudiés. Les différentes opérations du brassage traditionnel du *dolo* et du *pito* ont été suivies dans les six (6) sites de production ; les diagrammes de production correspondants ont été établis puis un diagramme général de brassage traditionnel de la bière de sorgho a été élaboré.

#### III.1.1.2 Echantillonnage

Quatre sites de production ont été retenus pour les prélèvements d'échantillons associés au brassage du *dolo* et du *pito*. Ce sont les sites de Samandin et Zone1 (Ouagadougou, Burkina Faso) et les sites de Tamale town et Nyankpala (Tamale, Nord Ghana). Trois et deux séries de prélèvements à des périodes distinctes ont été effectuées respectivement dans les sites de Ouagadougou et Tamale. Pour chaque série l'échantillon (200 g ou 200 ml) est prélevé en double aux différentes étapes du brassage, depuis la matière première jusqu'au produit fini. Ainsi, selon le site de production, 7 à 12 échantillons ont été prélevés dans des bocal à fermeture vissant préalablement stérilisés. Les échantillons ainsi conditionnés ont été placés dans une glacière contenant la glace puis transportés au laboratoire où ils ont été conservés à 4°C pour les analyses.

### **III.1.2 Analyses physico-chimiques**

Le pH des échantillons a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre, l'acidité titrable par titrimétrie avec du NaOH 0,1N. L'acidité titrable a été exprimée en g d'acide lactique/100 ml (ou /100 g) de produit selon la relation utilisée par Amoa-Awua *et al.* (1996).

### **III.1.3 Analyses microbiologiques**

Le dénombrement des microorganismes, l'isolement et la purification des isolats à partir des échantillons prélevés à Tamale ont été réalisés au Laboratoire de Microbiologie UDS/DANIDA de « University for Development Studies » à Tamale. Les mêmes analyses sur les échantillons prélevés dans les sites de production de Ouagadougou, ainsi que la caractérisation phénotypique de tous les isolats collectés ont été réalisées au laboratoire de microbiologie du Département Technologie Alimentaire (DTA) de l'IRSAT/CNRST (Ouagadougou).

#### ***III.1.3.1 Dénombrement des microorganismes dominants***

La technique de comptage de colonies sur milieu gélosé a été utilisée. Les bactéries aérobies mésophiles ont été dénombrées sur le milieu Plate Count Agar (PCA) après un ensemencement en surface et une incubation à 37°C pendant 48h. Les bactéries lactiques ont été dénombrées sur le milieu gélosé de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) après un ensemencement dans la masse et une incubation à 37°C pendant 72h en condition d'anaérobiose (jarre d'anaérobiose, système Anaerocult A). Le milieu Malt Agar (MA) contenant par litre, 100 mg de chloramphénicol et 50 mg chlorotétracycline a été utilisé pour le dénombrement des levures et moisissures après incubation à 30°C pendant 72 heures. Les résultats sont exprimés en Unité Formant Colonie (UFC)/ml (ou /g).

#### ***III.1.3.2 Isolement / purification et détermination des caractéristiques phénotypiques des isolats dominants***

Les colonies sur les milieux PCA (flore aérobie) et MRS (bactéries lactiques) ont été isolées et purifiées par des ensemencements successifs en utilisant des bouillons et les milieux gélosés correspondants. Les isolats ainsi obtenus ont été caractérisés par la morphologie des colonies et des cellules après observation au microscope en contraste de phase, la réaction de Gram (Gregersen, 1978), la réaction de la catalase, la production de gaz à partir du glucose sur le milieu semi-solide de

Gibson et Abdel-el-Malek (Guiraud, 1998), la croissance à 10°/15°C et 45°C, la croissance à pH 9,2 et la croissance en présence de NaCl à 6,5%. Les isolats présumés lactiques (bacilles, coccobacilles, cocci, Gram-positif, catalase-négative) ont été conservées à -20°C dans un mélange de bouillon MRS et de glycérol à 50% (v/v) pour la caractérisation génotypique et l'identification.

### ***III.1.3.3 Caractérisation génotypique et identification des isolats de bactéries lactiques***

Cette partie du travail a été réalisée l'Université de Copenhague (Danemark) au « Department of Food Science, Food Microbiology ». L'approche polyphasique combinant des méthodes phénotypiques et génotypiques a été utilisée.

- Les profils de fermentation des hydrates de carbone des isolats ont été déterminés en utilisant les kits API 50 CHL (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) selon les instructions du fabricant. Les isolats ont été identifiés par présomption à l'aide du logiciel APILAB Plus version 3.3.3 (BioMerieux).

- L'analyse du ITS-PCR /RFLP des isolats (portion d'ADN correspondant à l'espace inter génique 16S-23S du gène codant pour l'ARNr) a été réalisée selon la méthode utilisée par Lei et Jakobsen (2004) et précédemment décrite (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007). L'ADN a été extrait puis amplifié en utilisant Cy5-16S 1500F (5'-AAG TCG TAA CAA GGT A-3') et 23S-32R (5'-GCC ARG GCA TGG ACC-3') comme amorces (primer). Les produits PCR ont été digérés avec l'endonucléase de restriction Taq<sup>q</sup>I. Les fragments ITS-PCR et les fragments de restriction RFLP ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les gels ont été visualisés sous des rayonnements UV puis photographiés. La position des bandes et l'intensité (taille) des fragments ont été analysées avec le programme informatisé "Kodak ID Image Analysis software version 3.5" (VWR International Kodak ApS, Albertslund, Denmark).

- L'électrophorèse en champ pulsé de l'ADN ou Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) a été utilisée pour l'étude de la biodiversité des isolats; la méthode de Lei et Jakobsen (2004), précédemment décrite (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007) a été utilisée. L'ADN des isolats a été extrait, purifié, digéré avec une enzyme de restriction puis les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse en champ pulsé sur gel d'agarose. Les enzymes *Apa* I et *Asc* I ont été utilisées comme endonucléases de restriction. L'analyse de groupes d'isolats homogènes (cluster analysis)

en utilisant les profils PFGE a été réalisée avec le logiciel BioNumerics 2.50 (Applied Maths, Sint-Martens-Latam, Belgium), puis un dendrogramme a été construit.

- L'identification effective des isolats a été faite par le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S selon la méthode indiquée au chapitre II. L'ADN a été extrait, purifié puis amplifié en utilisant les amorces (primers), forward U968gc (5'-GAA CGC GAA CCT TAC-3') et reverse L1401 (5'-GCG TGT GTA CAA GAC CCC-3'). L'amplification de l'ADN purifié pour le séquençage a été faite avec les amorces (primers) forward 970 F (5'-GGA CGC GAA CCT TAC-3') et reverse 1372 R (5'-CAG GCC CGG GAA CGT ATT CAC-3'). L'électrophorèse et le séquençage de l'ADN ont été réalisés avec le "CEQ 2000 DNA Analysis system" (Beckman Coulter, California USA). La séquence de l'ADN et l'identité des isolats ont été obtenues par la banque de données de gènes BLAST Gen database ([www.ncbi.nlm.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.gov/blast)).

## III.2 Résultats

### III.2.1 Le brassage traditionnel du *dolo* et du *pito* dans les sites étudiés

Les productrices de *dolo* et de *pito* des sites de Samandin, Wayalguin, Zone1, Tamale town et Nyankpala sont des femmes de la cinquantaine d'âge au moins, avec un minimum d'expérience de 30 ans. Toutes ont révélé avoir appris le savoir-faire avec leurs mères ou grand-mères. Le site de Gaoua est la propriété d'une association de femmes de tout âge et les membres y fabriquent le *dolo* à tour de rôle moyennant une somme forfaitaire qui alimente la caisse de l'association. Le cycle de production dans les sites étudiés a été de 2 ou 3 fois par semaine avec en moyenne 225 à 900 litres de *dolo* par production. Les unités de production de Burkina sont de plus grande capacité et emploient 4 à 6 personnes, parmi lesquelles on compte au plus deux hommes pour l'exécution de tâches particulières. Les employés sont payés par production ou mensuellement. Les unités de production de Tamale (Ghana) sont par contre de petite capacité et la production est assurée par une ou deux personnes.

**La matière première utilisée :** le malt de sorgho rouge est exclusivement utilisé pour le brassage du *dolo* dans les sites de Ouagadougou (procédé *Mossi*). L'approvisionnement se fait auprès de fabricantes de malt ou de revendeuses de malt à Ouagadougou ou dans les villages environnants. Par contre à Gaoua et à Tamale, la bière de sorgho est produite avec le mélange malt de sorgho rouge et



sorgho blanc, ou uniquement avec le malt de sorgho blanc et les productrices de la bière traditionnelle fabriquent elles mêmes le malt de sorgho.

**Les matières auxiliaires :** l'écorce de *yolga* (*Grewia bicolor*, Juss), une plante mucilagineuse, est utilisée dans tous les sites étudiés, pendant l'empâtage pour favoriser la décantation et la clarification du moût. Selon les productrices, toute plante mucilagineuse alimentaire peut être utilisée comme par exemple les gousses ou tiges de gombo (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench), les feuilles de baobab (*Adansonia digitata*), les feuilles de kapokier (*Bombax costatum*, Pellegr et Vuillet). La levure locale provenant de la production précédente est recueillie, séchée au soleil puis une portion est utilisée pour la fermentation alcoolique du moût.

**Le brassage du dolo et du pito :** le procédé est artisanal et le matériel utilisé se compose principalement de Calebasses, de jarres et canaris en argile cuite, de marmites en fonte, de cuvettes en aluminium ou en fer peint, de fûts de récupération en fer ou en matière plastique, de paniers en pailles tressées. La source d'énergie est le bois de chauffe avec l'utilisation de foyers améliorés construits en banco, munis de cheminées. Les diagrammes de brassage sont similaires pour ce qui concerne les principales étapes. La figure 8 présente le diagramme général de brassage du *dolo* et du *pito* dans les unités de production étudiées. Le brassage du *dolo* et du *pito* dure deux jours et deux nuits et le produit fini est obtenu le matin du troisième jour. Les principales opérations sont: le broyage du malt de sorgho, l'empâtage, l'acidification, la cuisson/concentration du moût, le refroidissement/décantation, l'ensemencement avec la levure locale et la fermentation alcoolique.

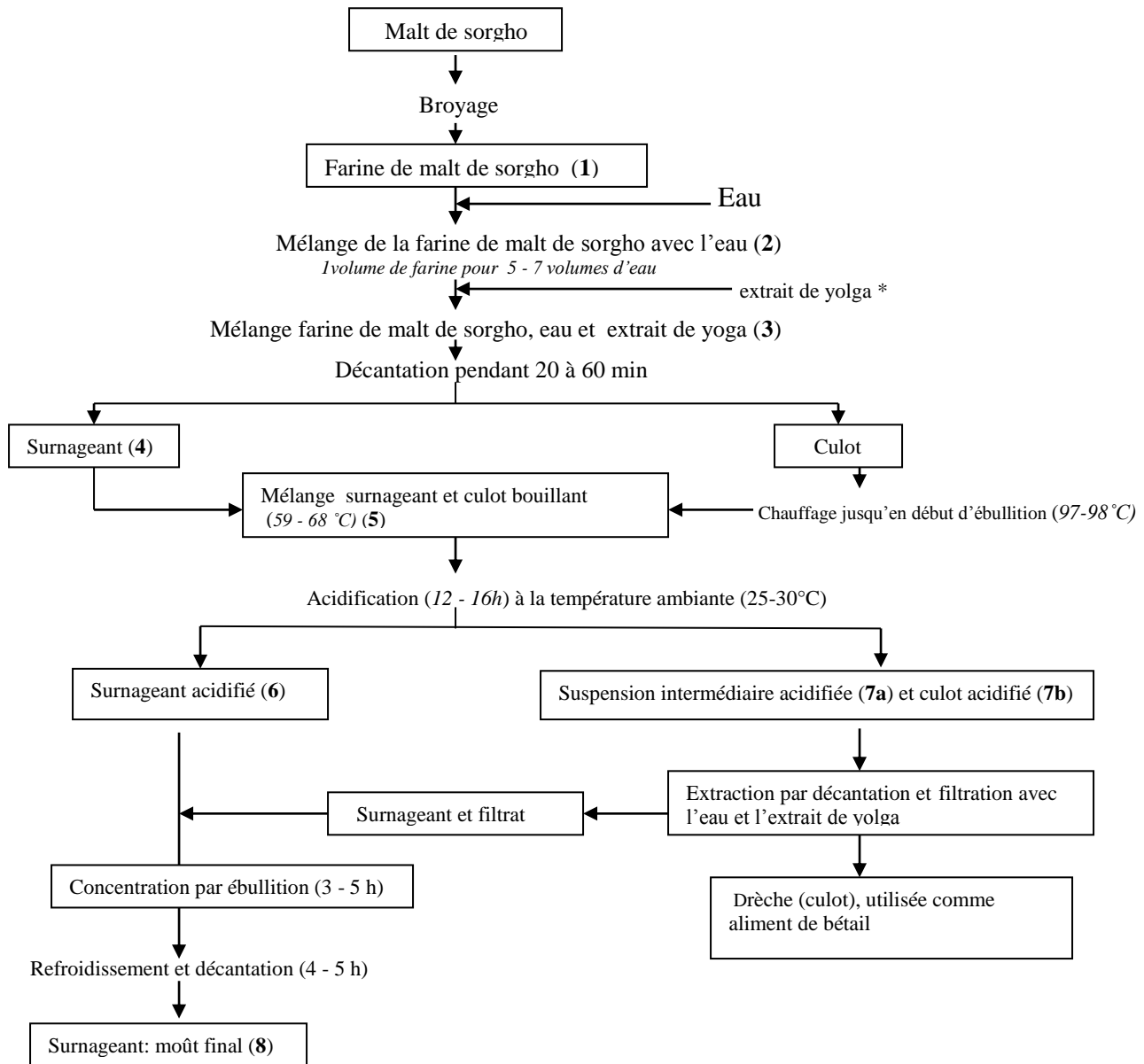
Le malt de sorgho est broyé grossièrement (étape 1) par des moulins ambulants spécialisés dans la mouture du malt de sorgho à Ouagadougou et à Gaoua, et par les moulins de quartiers à Tamale.

L'empâtage et l'acidification: l'empâtage est l'opération de mise en suspension aqueuse de la farine de malt pour l'extraction des substances hydrosolubles. Une suspension aqueuse de farine de malt de sorgho est préparée dans une jarre par malaxage manuelle (étape 2), puis l'extrait aqueux de *yolga* est ajouté (étape 3). La solution est laissée à décanter pendant 20 à 60 minutes selon les sites, puis le surnageant est collecté dans des jarres (étape 4) et le culot est chauffé jusqu'à ébullition dans des marmites en fonte. Le culot bouillant est mélangé au surnageant (étape 5). Le mélange est alors laissé à acidifier toute une nuit, soit 12 - 16 h selon les sites, puis le surnageant acidifié est collecté (étape 6). La suspension intermédiaire acidifiée (étape 7a) et le culot acidifié (étape 7b) sont traités

par filtration et/ou décantation. Les filtres sont constitués de jarres perforées (procédé *mossi*) ou de paniers en paille ou en rosier tressé (procédés *dagara* et *dagarti*) et la drêche sert de matière filtrante. Le résidu est rincé à l'eau puis à l'extrait de *volga*. Les filtrats sont collectés puis mélangés au surnageant acidifié.

La concentration du moût : le mélange constitué par le surnageant acidifié et les filtrats est concentré par ébullition pendant 3 - 5 heures. Le moût concentré est laissé à refroidir et à décanter à la température ambiante pendant 4 - 5 heures. Le surnageant obtenu est collecté dans des jarres et constitue le moût final (étape 8) prêt pour la fermentation alcoolique. Le moût final est alorsensemencé avec de la levure locale, puis laissé à fermenter toute une nuit, soit 9 - 12 heures. Le lendemain matin, la bière traditionnelle mousseuse et pétillante est prête pour la consommation. Le *dolo* ou *pito* est conditionné dans des canaris pour la vente aux consommateurs dans les cabarets ou aux revendeuses de *dolo*.

Une différence a été constatée dans l'utilisation de l'extrait de *volga* dans les sites étudiés. L'extrait de *volga* est utilisé à une concentration et à un volume plus importants dans les unités de Tamale et Gaoua (procédés *dagarti* et *dagara*) par rapport à celles de Ouagadougou (procédé *mossi*). Dans le site de Samandin, l'écorce de *volga* après un trempage de quelques heures dans l'eau, est pilée au mortier-pilon, puis malaxée directement dans la suspension aqueuse de farine de malt. Dans les autres sites, une solution aqueuse mucilagineuse est préparée à partir de l'écorce trempée et pilée, puis la solution est ajoutée à la suspension aqueuse de farine de malt (Zone1 et Wayalguin), ou bien mélangée à l'eau utilisée pour la préparation de la suspension de mouture de malt (Tamale town, Nyankpala, Gaoua).



\*: l'extrait aqueux de yolga (*Grewia bicolor*, Juss) est utilisé pour favoriser la décantation.

**Figure 8 :** Diagramme général du procédé traditionnel de production du moût du dolo et du pito dans les quatre sites à Ouagadougou et Tamale; les chiffres en gras entre parenthèses indiquent les étapes d'échantillonnage. 1: farine de malt de sorgho; 2 à 5: empâtage; 6-7: acidification; 8: moût final ; le produit fini (*dolo*, *pito*) est obtenu après ajout de la levure locale au moût final, suivi d'une fermentation alcoolique de 9-12h.

### III.2.2 Evolution du pH, de l'acidité titrable et de la population microbienne pendant le brassage du *dolo* et du *pito*

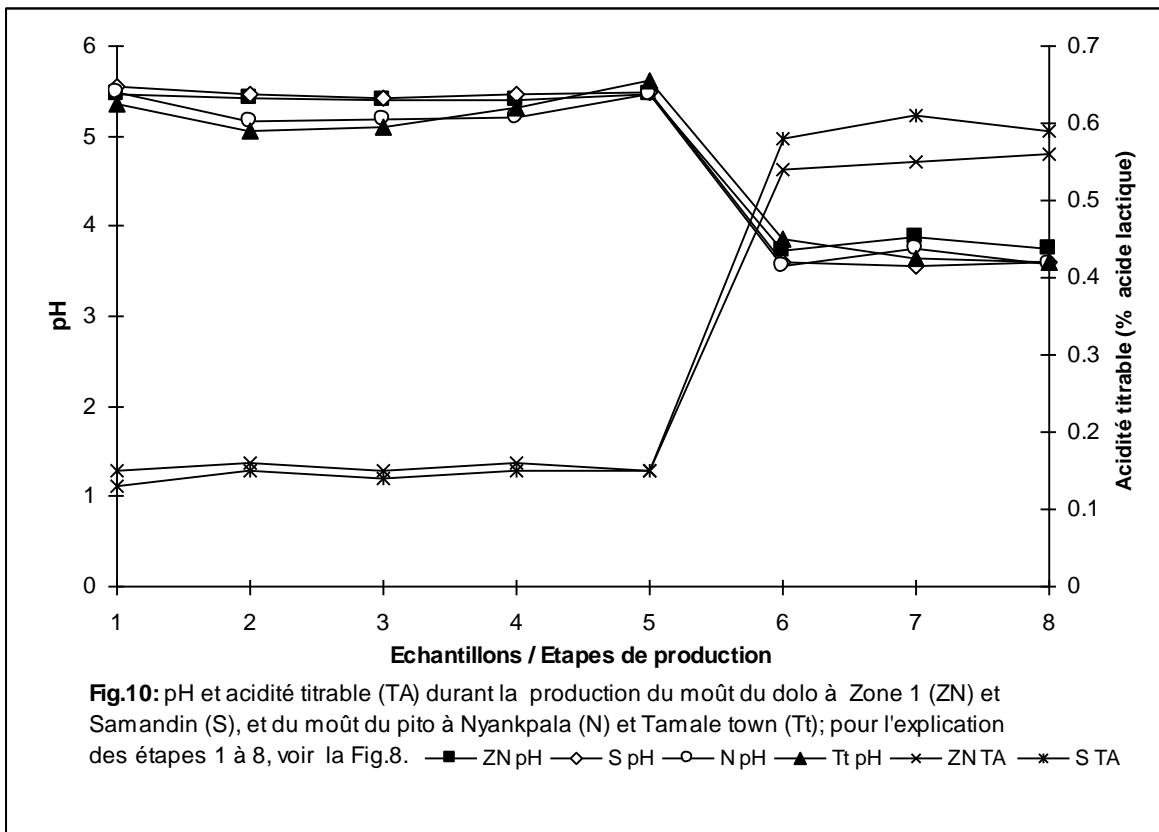
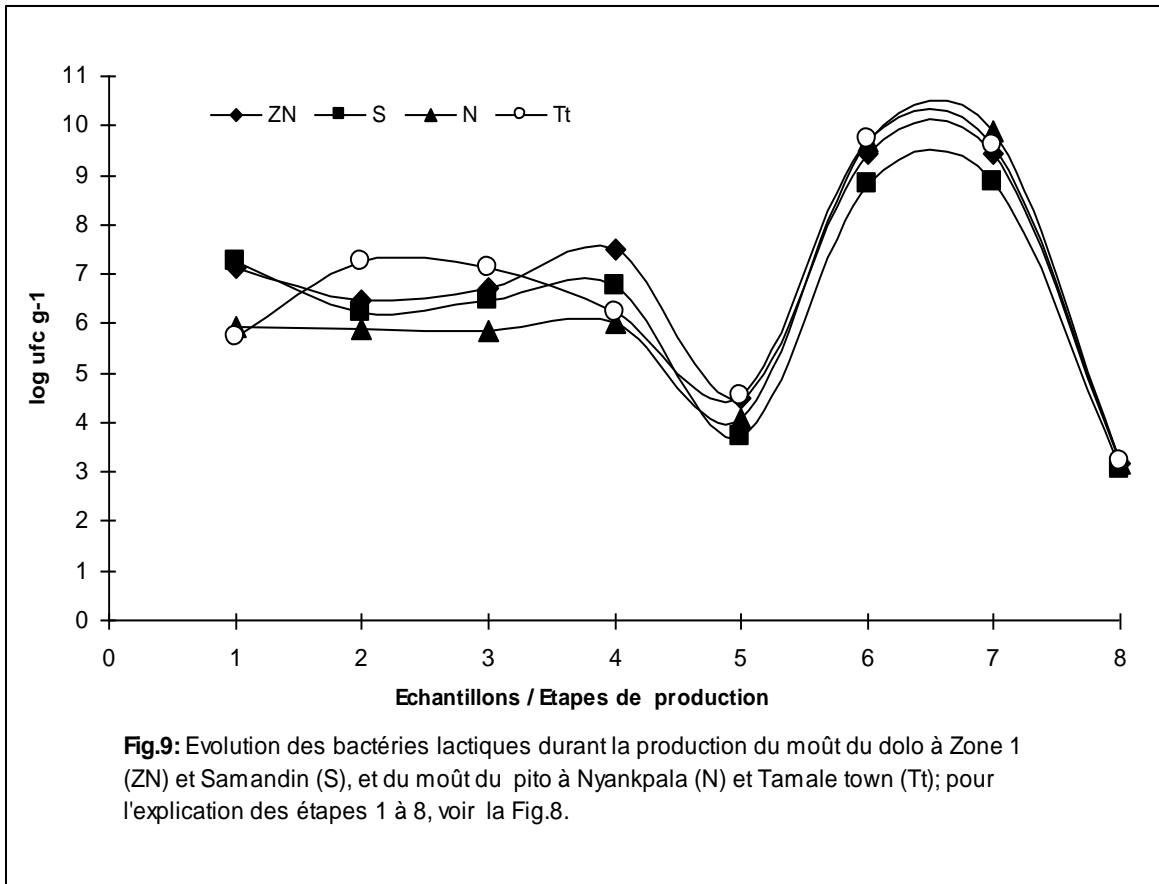
Quatre sites ont été concernés par les prélèvements d'échantillons, les analyses microbiologiques, la collecte et l'identification des isolats. Ce sont les sites de Samandin et Zone 1 (Ouagadougou, Burkina Faso) et les sites de Tamale twon et Nyankpala (Tamale, Ghana). Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article publié (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007) joint en annexe.

Les bactéries lactiques dans la farine de malt de sorgho et dans les échantillons prélevés pendant l'empâtage ont été de l'ordre de 5,7-7,5 log ufc/g dans les 4 unités de production (Fig.9). Des niveaux similaires de bactéries Gram-négatif, catalase-positive et de levures ont été observés dans les mêmes échantillons (Tableaux XI (a, b et c), Annexe). La fin de l'empâtage qui est marquée par une opération consistant à mélanger le culot bouillant au surnageant (étape 5) a entraîné une réduction de la charge de bactéries lactiques des échantillons prélevés à cette étape (3,7-4,5 log ufc/g), alors que les bactéries Gram-négatif, catalase-positive n'ont plus été détectées.

Les plus fortes concentrations microbiennes ont été observées dans les échantillons de Tamale. La température du culot bouillant a été de 97-98°C, température assez suffisante pour détruire la plupart des microorganismes thermosensibles; cette température a permis d'élever par la suite celle du mélange (culot bouillant et surnageant) à 59-68°C (Fig.8), ce qui a favorisé l'inactivation de certains microorganismes thermosensibles présents dans le surnageant, d'où la réduction de la charge microbienne.

Après 12-16 h d'acidification, un développement bactérien a été observé dans les échantillons acidifiés (6, 7a, 7b) avec des charges de 8,8-9,9 log ufc/g ; parallèlement, le pH de la suspension a baissé de 5,46-5,61 à 3,56-3,90 et l'acidité titrable a augmenté de 0,13% à 0,61% acide lactique (Fig.10, Tableau XI d en Annexe). La croissance des bactéries Gram-négatif, catalase-positive et des levures a été par contre inhibée (Tableau XI c, Annexe). Le développement des bactéries lactiques et l'abaissement concomitant du pH montrent que l'acidification du moût résulte d'une fermentation lactique naturelle non contrôlée.

Le moût concentré et refroidi a un pH de l'ordre de 3,57-3,76 et contient peu de bactéries lactiques (2-3 log ufc/ml). L'ensemencement avec la levure locale suivie de la fermentation alcoolique de 9-12h donne un produit fini (*dolo*, *pito*) avec un pH de l'ordre de 3,46-3,64 et des charges de 5-6 log ufc/ml de bactéries lactiques et 7-8 log ufc/ml de levures (Tableaux XI c, XI d et XI e, Annexe).



### **III.2.3 Les espèces dominantes de bactéries lactiques identifiées**

Un total de 556 isolats Gram-positif, catalase-négative, non sporulants, immobiles, composés de bacilles, coccobacilles, cocci ou cocci formant des tétrades ont été collectés à partir des échantillons prélevés aux différentes opérations de brassage du *dolo* (381 isolats) et du *pito* (175 isolats). Ces isolats sont pour la plupart hétérofermentatifs: 91% des isolats de Ouagadougou et 89% des isolats de Tamale.

#### ***III.2.3.1 Les profils ITS-PCR/RFLP des isolats***

Au total 350 isolats (179 isolats provenant du brassage du *dolo* et 171 du brassage du *pito*) ont été utilisés pour l'analyse de l'ADN par l'ITS-PCR/RFLP. Les isolats ont été regroupés selon les profils ITS-PCR nommés A, B, C, D, E, F, H, G et O et dont les caractéristiques sont données dans le Tableau XII. Les profils A, B, C, D, E ou F présentent des similarités par rapport au nombre et à la taille des bandes ou fragments. Les isolats dominants ont présenté les profils D (32,6% des isolats), A (26 %) et C (22,6%). Les profils D et A ont été observés aussi bien parmi les isolats issus du brassage du *dolo* que du *pito*; le profil C a été principalement observé parmi les isolats issus du brassage du *dolo*, alors que le profil B est principalement observé parmi les isolats issus du brassage du *pito*. Le profil E a été observé pour très peu d'isolats de Tamale; le profil F a été observé pour très peu d'isolats de Ouagadougou et de Tamale. Après l'action de l'endonucléase Taq<sup>q</sup>I, les isolats ayant présenté les profils ITS-PCR A, B, C, D, E et F ont été répartis en 4 groupes principaux (a, b, c et d) correspondants à leurs profils RFLP (Tableau XII).

#### ***III.2.3.2 L'identification des isolats par l'analyse de la séquence partielle de l'ADN***

Un total de 59 isolats représentant les différents profils ITS-PCR/RFLP et les étapes de brassage ont été utilisés pour l'analyse de la séquence partielle de l'ADN (région 968- 1401). Le Tableau XIII présente les résultats obtenus. Les isolats ayant présenté les profils ITS-PCR A, B, C, D, E et F (92% des isolats) ont été identifiés comme *Lact. fermentum* (97-99% de similarité); les isolats du profil H (2,9% des isolats) ont été identifiés comme *Ped. acidilactici* (98% de similarité); ceux du profil G (2,3% des isolats) comme *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* (97-98% de similarité). Le reste des isolats (2,8%) se référant au profil O ont été identifiés comme *Lactococcus lactis* ssp.

*lactis*, *Leuconostoc lactis* avec de bas pourcentages de similarité, respectivement 93% et 95%, *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* avec 98% de similarité, *Lact. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* avec 98% de similarité et des isolats non identifiés qui pourraient être de nouvelles espèces (Tableau XIII). Seules les identités *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* et *Leuconostoc lactis* ont été retenues sur la base de caractéristiques phénotypiques. Les profils ITS-PCR/RFLP des espèces identifiées sont illustrés par la Figure 11.

### **III.2.3.3 Les profils de fermentation des sucres des espèces dominantes identifiées**

Au moins 95% des isolats de *Lact. fermentum* ont la capacité de fermenter le D-glucose, le D-fructose, la L-arabinose, le ribose, le saccharose, le D-xylose, le maltose, le melibiose, le D-raffinose et le gluconate ; mais aucun isolat n'a la capacité de fermenter l'amidon. Les isolats de *Ped. acidilactici* ont la capacité de fermenter le D-glucose, le D-fructose, la L-arabinose, le galactose, le D-mannose, l'amygdaline, l'esculine, le cellobiose, la  $\beta$ -gentiobiose et le D-tagatose, mais n'ont pas la capacité de fermenter l'amidon. Les isolats de *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* fermentent le D-glucose, le D-fructose, le maltose, l'esculine, le cellobiose, le saccharose et le tréhalose mais pas le lactose; par contre *Lact. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fermente le lactose mais pas le maltose et le cellobiose (Tableau XIV, Annexe).

**Tableau XII:** Produits ITS-PCR/RFLP de 350 isolats de bactéries lactiques provenant des sites de production du *dolo* (Ouagadougou, Burkina Faso) et du *pito* (Tamale, Ghana).

Produits ITS-PCR		Produits RFLP		% d'isolats		
Profil	Dimensions/tailles des fragments en pair de base (bp)	profil	Dimensions /tailles des fragments (pb)	Total	Brassage du Dolo	Brassage du Pito
A	773±24; 549 ±17; 486±13; 409±14; 290±8	a <sup>1</sup> (b, c)	389±11; 332±9; 203 ±13; 135 ±10; 90 ±7	26	13,14	12,85
B	773±24; 486±13; 409 ±14; 290±8	b <sup>1</sup> (a, c)	551±16; 389±11; 332±9; 203 ±13; 135 ±10; 90 ±7	6,8	1,10	5,71
C	549±17; 486±13; 409 ±14; 290±8	c	332±9; 203 ±13; 135 ±10; 90 ±7	22,6	19,14	3,43
D	486±13; 409±14; 290±8	d	203 ±13; 135±10; 90 ±7	32,6	13,43	19,14
E	773±24; 549 ±17; 486±13; 409±14; 290±8; 209±8	a b	389±11; 332±9; 203 ±13; 135 ±10; 90 ±7 551±16; 389±11; 332±9; 203 ±13; 135 ±10; 90 ±7	2	0	2
F	773±24; 486±13; 409 ±14; 290±8; 209 ±8	d	203 ±13; 135±10; 90 ±7	2	0,30	1,71
H	488±19; 420±14; 296±16	h	343±29, 280±36; 200±17	2,9	1,43	1,43

<sup>1</sup>: la plupart des isolats ont donné le profil indiqué mais certains ont donné le profil entre parenthèse



**Tableau XIII:** Identification par le séquençage du gène codant pour l'ARN r 16S des isolats de bactéries lactiques impliquées dans le brassage du *dolo* à Ouagadougou et du *pito* à Tamale.

Etapes de production / Echantillon	Nombre d'isolats	Profils ITS-PCR										Séquençage du gène codant pour l'ARN r 16S	
		A	B	C	D	E	F	G	H	O	Identification	Similarité (%)	
Etape1 <sup>1</sup>  Farine de malt de sorgho (SMF)	42	19	3	11	3	1	-	-	5	-	A <sup>2</sup> : <i>Lact. fermentum</i>	98	
											A: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											B: <i>Lact. fermentum</i>	97	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	97	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											H: <i>Pediococcus acidilactici</i>	98	
Etape2 <sup>1</sup> & Etape 3 <sup>1</sup>  SMF mélange à l'eau & SMF mélangé à l'eau et l'extrait de yolga	37	18	3	3	9	-	-	-	2	2	A: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											H: <i>Ped. acidilactici</i>	98	
											O: <i>Leuconostoc lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	95	
											O: <i>Acetobacter pomorum</i>	98	
Etape4 <sup>1</sup>  Surnageant	51	11	8	11	15	2	4	-	-	-	A: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											B: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											F: <i>Lact. fermentum</i>	98	
Etape 5 <sup>1</sup> Surnageant mélangé au culot bouillant	36	11	3	2	15	1	-	2	-	2	A: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											A: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											B: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											B: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											E: <i>Lact. fermentum</i>	97	
											O: non identifié	-	
											O: <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	98	

<sup>1</sup>: voir la Fig.8 pour les explications

<sup>2</sup>: les lettres indiquent le profil ITS-PCR de l'isolat utilisé pour le séquençage du gène codant pour l'ARN r 16 S

**Tableau XIII (suite):**

Etapes de production / Echantillon	Nombre d'isolats	Profils ITS-PCR									Séquençage du gène codant pour l'ARN r 16S	
		A	B	C	D	E	F	G	H	O	Identification	Similarité (%)
Etape 6 <sup>1</sup> Surnageant acidifié	64	22	5	17	14	3	-	3	-	-	A <sup>2</sup> : <i>Lact. fermentum</i>	99
											A: <i>Lact. fermentum</i>	99
											A: <i>Lact. fermentum</i>	98
											B: <i>Lact. fermentum</i>	99
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98
											C: <i>Lact. fermentum</i>	99
											C: <i>Lact. fermentum</i>	99
											D: <i>Lact. fermentum</i>	98
											E: <i>Lact. fermentum</i>	97
										G: <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	97	
Etape 7 <sup>1</sup> Suspension intermédiaire et culot acidifiés	66	9	1	18	28	-	1	2	3	4	A: <i>Lact. fermentum</i>	98
											A: <i>Lact. fermentum</i>	98
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98
											C: <i>Lact. fermentum</i>	99
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98
											D: <i>Lact. fermentum</i>	98
											D: <i>Lact. fermentum</i>	98
											F: <i>Lact. fermentum</i>	99
											G: <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	97
											H: <i>Ped. acidilactici</i>	98
									H: <i>Ped. acidilactici</i>	98		
									O: <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	98		
Extract de Yolga	21	-	2	3	13	1	-	-	-	2	C: <i>Lact. fermentum</i>	98
											D: <i>Lact. fermentum</i>	99
											O: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	93
											O: non identifié	-
Produits finis: <i>dolo</i> , <i>pito</i>	33	-	1	14	17	-	-	-	-	1	C: <i>Lact. fermentum</i>	98
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98
											D: <i>Lact. fermentum</i>	98
											O: non identifié	-

<sup>1</sup>: voir la Fig.8 pour les explications

<sup>2</sup>: les lettres indiquent le profil ITS-PCR de l'isolat utilisé pour le séquençage du gène codant pour l'ARN r 16 S

#### **III.2.3.4 La distribution des espèces dominantes selon les sites et les étapes de production**

Le Tableau XV montre clairement que *Lact. fermentum* est l'espèce dominante associée aux différentes étapes du brassage du *dolo* et du *pito*. Cette espèce a dominé la microflore dans la farine de malt de sorgho (77-100% des isolats), pendant l'empâtage (80-100%), du début (75-100%) à la fin de l'acidification (60-100%), dans l'extrait de *yolga* (75%) et même dans le produit fini (*dolo* ou *pito*) (87-100%). Les espèces *Lact. delbrueckii* et *Ped. acidilactici* ont été observées dans la suspension intermédiaire et le culot acidifiés. *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc lactis* ne sont pas impliquées dans l'acidification. Tous les isolats du site de Samandin appartiennent à une seule espèce, *Lact. fermentum*.

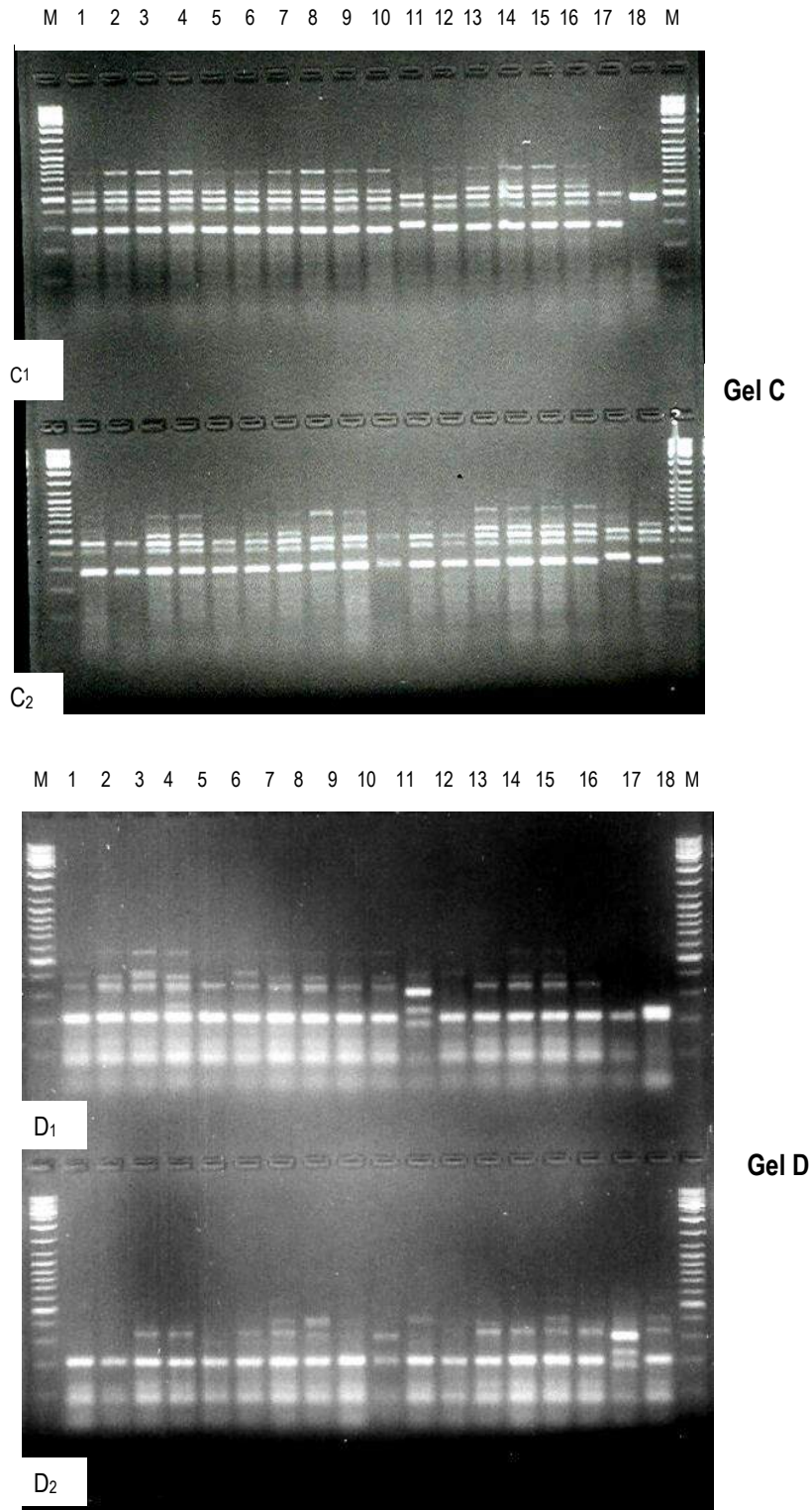
#### **III.2.3.5 La biodiversité des isolats**

L'analyse de l'ADN des isolats par le PFGE a mis en évidence leur diversité. L'action de l'enzyme de restriction Apa I sur l'ADN a généré des profils PFGE comportant au moins 20 fragments d'ADN (Fig. 12), à travers lesquels la plupart des isolats sont différents les uns des autres. L'enzyme Asc I a généré des profils PFGE de 8-15 fragments d'ADN mettant également en évidence une diversité des isolats (Fig. 12). L'analyse de groupes d'isolats homogènes (cluster study) à partir des profils PFGE/Asc I a donné le dendrogramme illustré par la Figure 13 qui met également en évidence le regroupement des isolats génétiquement proches selon les espèces. Les isolats de *Lact. fermentum* se regroupent par site de production; toutefois, il n'y a pas de regroupement systématique par opérations de brassage pour les isolats d'un même site. Les isolats de *Lact. delbrueckii* forment un groupe, de même que ceux de *Ped. acidilactici*. Ce résultat démontre une diversité des isolats d'une même espèce provenant d'un même site de production, mais indique également que les isolats d'un même site sont génétiquement plus proches entre eux qu'avec ceux provenant d'un autre site (Fig.13).

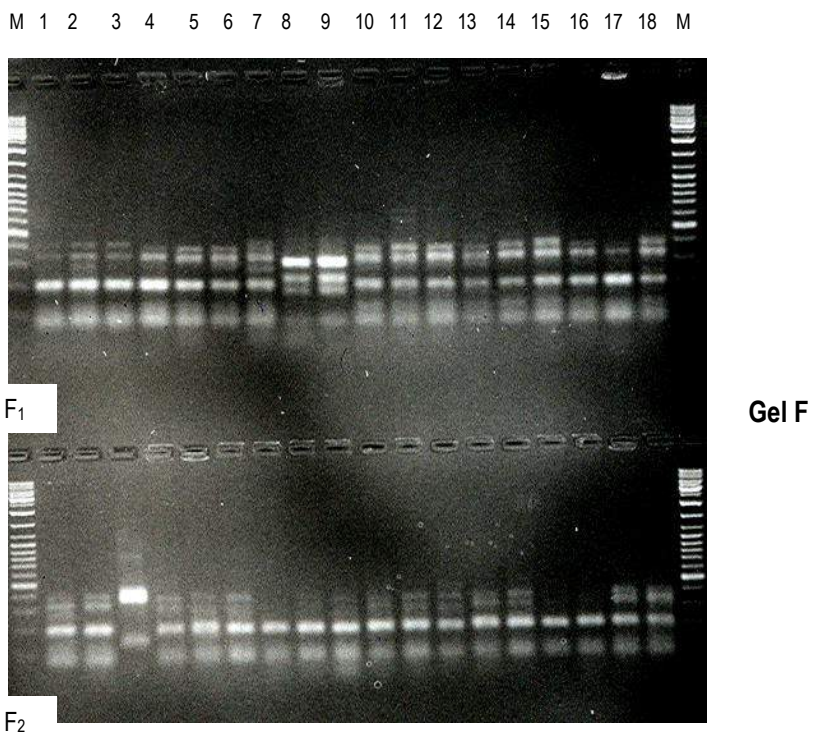
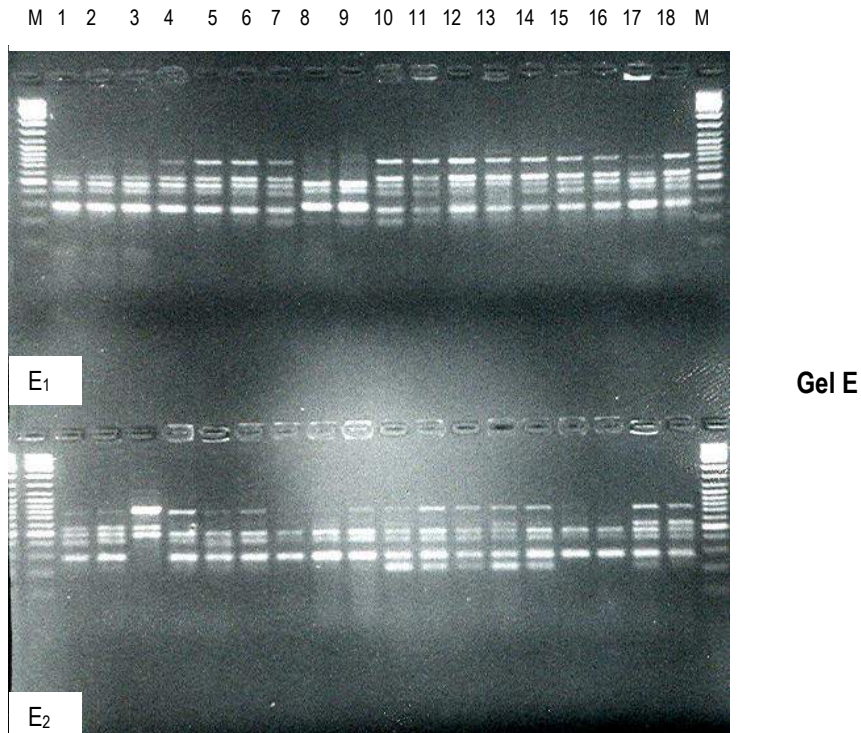
**Tableau XV: Distribution (%) des espèces de bactéries lactiques tout au long du brassage du *dolo* et du *pito* par sites et étapes de production**

Etapes de production / Echantillons	Sites de production du <i>dolo</i> (Ouagadougou)					Sites de production du <i>pito</i> (Tamale)						
	Zone 1					Samandin	Nyankpala			Tamale town		
	<i>Lact. ferm</i>	<i>Lact. delb</i>	<i>Ped. acid</i>	<i>Leu. lactis</i>	<i>L. lactis</i>	<i>Lact. ferm</i>	<i>Lact. ferm</i>	<i>Lact. delb</i>	<i>Ped. acid</i>	<i>Lact. ferm</i>	<i>Lact. delb</i>	<i>Ped. acid</i>
Etape 1. Farine de malt de sorgho (SMF)	90	- <sup>1</sup>	10	-	-	100	85,7	-	14,3	77,7	-	22,2
Etape 2. SMF mélangé à l'eau	80	-	10	10	-	nd <sup>2</sup>	nd			nd		
Etape 3. SMF mélangé à l'eau et l'extrait de yolga	85,7	-	14,3	-	-	nd	89	-	-	100	-	-
Etape 4. Surnageant	100	-	-	-	-	100	100	-	-	100	-	-
Etape 5. Surnageant mélangé au culot bouillant	75	12,5	-	-	-	100	88,2	11,7	-	100	-	-
Etape 6. Surnageant acidifié	90 95	10 5	-	-	-	100	94,1	5,9	-	90,9	9,1	-
Etape 7a. Suspension intermédiaire acidifiée	85,7	14,3	-	-	-	100	nd			nd		
Etape 7b. Culot acidifié	60	26,6	13,3	-	-	100	87,5	6,2	6,2	80	20	-
Extract de yolga	75	-	-	-	25	nd	87,5	-	-	100	-	-
Produits finis: <i>dolo</i> , <i>pito</i>	100	-	-	-	-	100	87,5	-	-	100	-	-

*Lact. ferm*: *Lactobacillus fermentum*; *Lact. delb*: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*; *Ped. acid*: *Pediococcus acidilactici*; *Leu. lactis*: *Leuconostoc lactis*; *L. lactis*: *Lactococcus lactis*; <sup>1</sup> -: non détecté parmi les isolats; <sup>2</sup> nd: non déterminé.

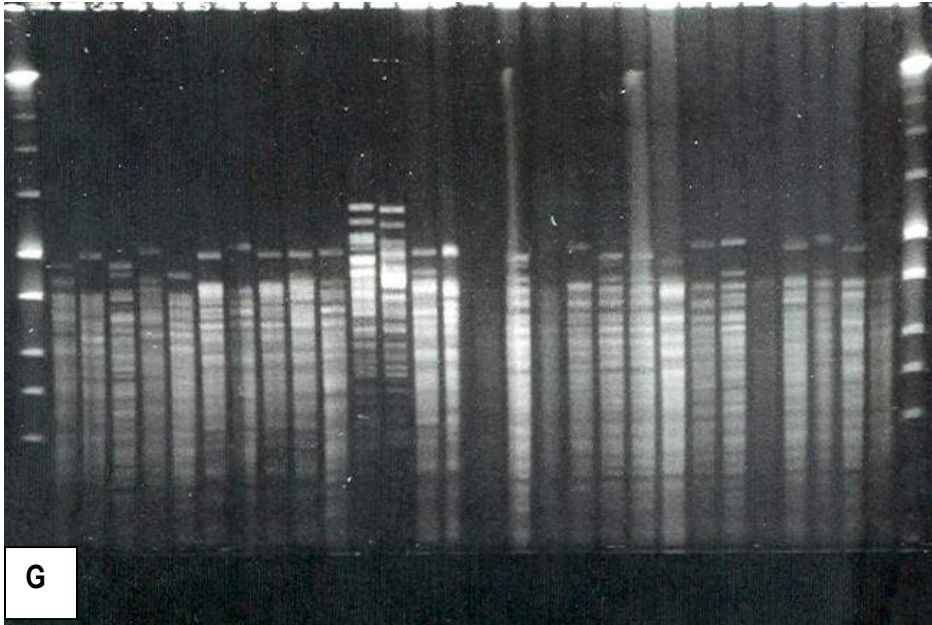


**Fig 11a: Gels d'agarose des produits ITS-PCR / RFLP** d'espèces dominantes de bactéries lactiques isolées du brassage du *dolo* à Zone 1 (Ouagadougou, Burkina Faso). **Gel C: profils ITS-PCR** des isolats. *Lact. fermentum* (C1: lignes 1 à 10, 12 à 17; C2: lignes 1 à 16 et 18); *Ped acidilactici* (C1: ligne 11; C2: ligne 17); *Leuconostoc lactis* (C1: ligne 18)  
**Gel D: profils RFLP** des mêmes isolats dans le même ordre. *Lact. fermentum* (D1: lignes 1 à 10, 12 à 17; D2: lignes 1 à 16 et 18), *Ped acidilactici* (D1: ligne 11; D2: ligne 17); *Leuconostoc lactis* (D1: ligne 18). M: DNA marker (DNA Ladder mix).

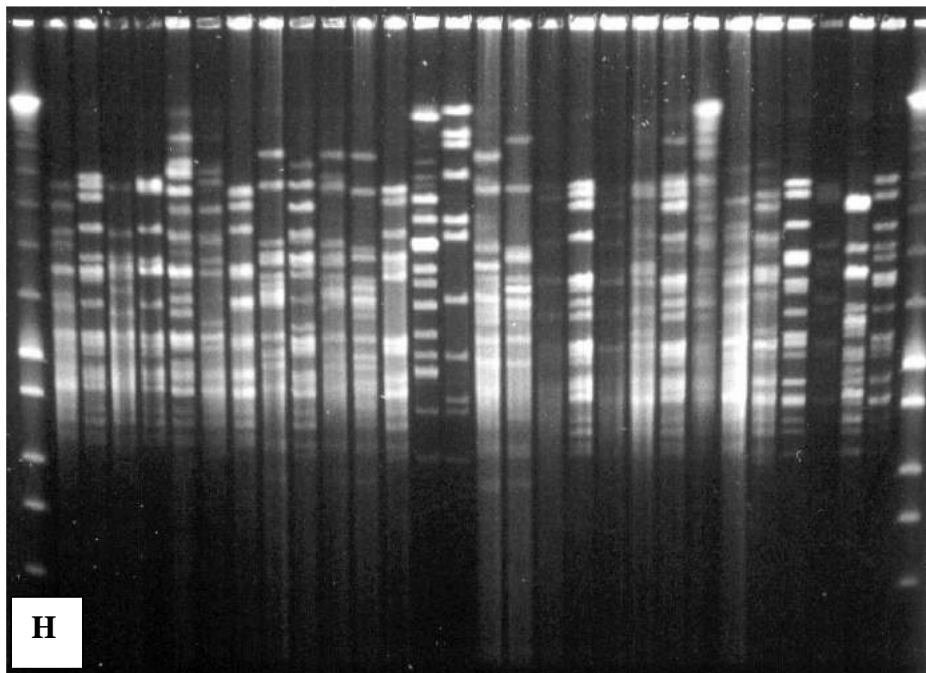


**Fig 11b: Gels d'agarose des produits ITS-PCR / RFLP** d'espèces dominantes de bactéries lactiques isolées du brassage du *pito* à Nyankpala (Tamale, Ghana). **Gel E: profils ITS-PCR** des isolats de *Lact. fermentum* (E1: lignes 1 à 7, 10 à 18; E2: lignes 1, 2 et 4 à 18), *Ped acidilactici* (E1: lignes 8 et 9) ; isolat non identifié (E2: ligne 3). **Gel F: profils RFLP** des mêmes isolats dans le même ordre. *Lact. fermentum* (F1: lignes 1 à 7, 10 à 18; F2: lignes 1, 2, 4 à 18) ; *Ped acidilactici* (E1: lignes 8 et 9); isolat non identifié (E2: ligne 3) M: DNA marker (DNA Ladder mix)

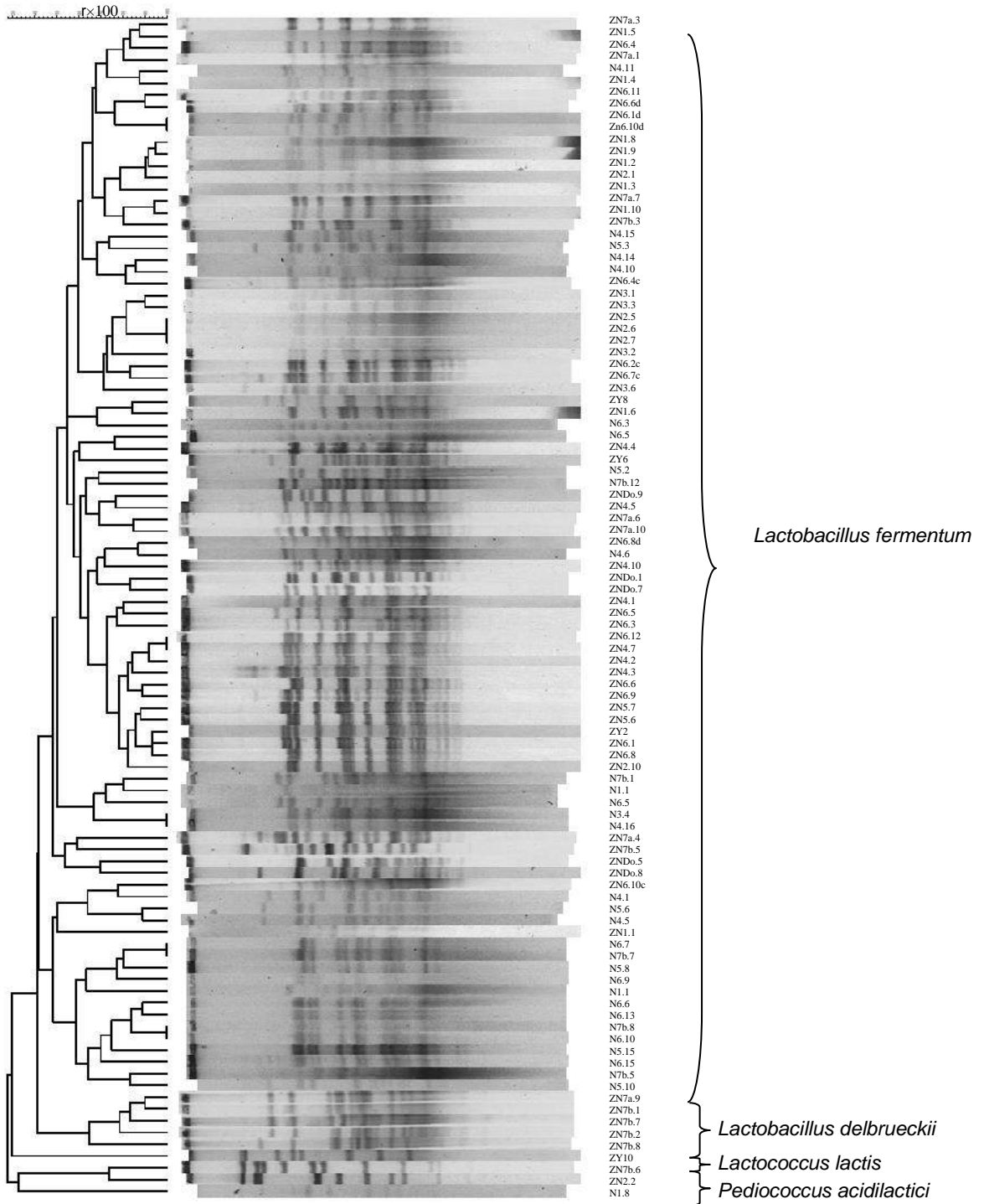
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 M



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 M



**Fig 12: Gels d'agarose des produits PFGE d'espèces dominantes de bactéries lactiques isolées du brassage du dolo à Zone 1 (Ouagadougou, Burkina Faso). Gel G: Profils PFGE- Apal des isolats de *Lact. fermentum* (lignes 1 à 5, 7, 10, 15 à 28) ; *Lact. delbrueckii* (lignes 6, 8, 9, 13 et 14) ; *Ped acidilactici* (lignes 11 et 12). Gel H: profils PFGE-Ascl des isolats de *Lact. fermentum* (lignes 1 à 7, 9, 12, 17 à 19, 21, 23 à 28) ; *Lact. delbrueckii* (lignes 8, 10, 11, 15 et 16) ; *Ped acidilactici* (lignes 13 et 14) ; isolats non identifiés (lignes 20 et 22) ; M: DNA marker (DNA Ladder mix)**



**Fig.13:** Dendrogramme construit sur la base des coefficients de similarité “Dices coefficient of similarity with the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages (UPGMA)” des profils PFGE-Asc I d’isolats de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* et *Pediococcus acidilactici*, impliqués dans la production du moût du *dolo* à Zone 1 (ZN) et du *pito* à Nyankpala (N). Pour les codes des isolats, les lettres indiquent les sites de production (ZN ou N); le premier chiffre indique l’étape de production (1 à 8, voir Fig. 8) et le second chiffre, le numéro de l’isolat. Do : *dolo* ; Y : extrait de *volga*.



### III.3 Discussion

En l'absence de données dans le domaine spécifique étudié, les résultats ont été comparés aux résultats antérieurs sur la fermentation lactique de produits à base de céréales. Le développement de bactéries lactiques, l'abaissement du pH et l'augmentation de l'acidité titrable résultant d'une fermentation lactique naturelle non contrôlée, observés au cours de cette étude, sont comparables à ceux enregistrés lors de fermentation lactique naturelle de produits à base de maïs (Halm *et al.*, 1993; Hounhouigan *et al.*, 1993b; Olsen *et al.*, 1995), de mil (Efiuvwevwere and Akona, 1995; Zvauya *et al.*, 1997; Lei and Jakobsen, 2004) et de sorgho (Odunfa and Adeyele, 1985; Achi, 1990; Nout, 1991; Sulma *et al.*, 1991; Gassem, 1999; Kunene *et al.*, 2000; Muyanja *et al.*, 2003).

Les profils de fermentation des sucres de nos isolats de *Lact. fermentum* corroborent avec ceux rapportés par Hounhouigan *et al.*(1993b). Cependant *Lact. fermentum* donne une réaction positive (dans plus de 90% des cas) pour la fermentation du ribose, galactose, glucose, fructose, melibiose, saccharose et raffinose et une réaction négative pour la fermentation de l'esculine, melezitose, amygdaline, mannitol, rhamnose et sorbitol (Hammes *et al.*,1992; Seseña *et al.*, 2004).

La prédominance de *Lact. fermentum* à toutes les étapes de production du moût du *dolo* et du *pito* semble être unique. La fermentation lactique naturelle non contrôlée mise en évidence durant le maltage du sorgho avec *Lact. fermentum* comme espèce dominante impliquée (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2009), semble donner un avantage compétitif à cette espèce pendant le brassage. *Lact. fermentum* a été identifiée comme espèce impliquée dans la technologie de fermentation de divers produits alimentaires à base de céréales, mais généralement associée à d'autres espèces (Fields *et al.*, 1981; Sulma *et al.*, 1991; Olsen *et al.*, 1995; Hounhouigan *et al.*, 1993a; Johansson *et al.*, 1995; Hamad *et al.*, 1997; Hayford *et al.*, 1999).

Une grande uniformité des espèces bactériennes identifiées est observée entre les sites et les étapes de production avec la dominance de *Lact. fermentum*. Cependant, à travers les profils ITS-PCR/RFLP et les profils PGFE de l'ADN, une biodiversité est observée au niveau des isolats d'une même espèce. Une spécificité est observée à Samandin où tous les isolats identifiés appartiennent à l'espèce *Lact. fermentum*, démontrant la sélection d'une seule espèce dans ce site et prédisposant ses isolats comme de potentiels cultures starter si leurs propriétés technologiques s'avéraient intéressantes. Une diversité des isolats a été également mise en évidence à travers leurs profils de fermentation des hydrates de carbone. La diversité biologique semble refléter le site et particulièrement l'étape de production. Ainsi, différents isolats ont été impliqués dans la fermentation lactique naturelle du moût du début à la fin, sans qu'un isolat particulier ne prédomine

en fin de fermentation. *Lact. fermentum* apparaît donc être un candidat évident pour la sélection de culture starter en vue d'une fermentation contrôlée du moût; toutefois, la biodiversité doit être prise en compte pour la sélection des souches. La biodiversité de souches de *Lact. fermentum* isolées de produits fermentés traditionnels a également été démontrée dans des travaux antérieurs (Hayford *et al.*, 1999; Lei and Jakobsen, 2004; Seseña *et al.*, 2004; Kostinek *et al.*, 2005).

Pour ce qui concerne les autres espèces bactériennes impliquées dans la fermentation du moût du *dolo* et du *pito*, *Lact. delbrueckii* a également été identifié dans des produits fermentés à base de blé (Corsetti *et al.*, 2001) et de sorgho (Muyanja *et al.*, 2003); *Ped. acidilactici* a été identifié dans le *mawè*, un produit fermenté à base de maïs (Hounhouigan *et al.*, 1993b). Dans le cas de la production du moût du *dolo* et du *pito*, ces deux espèces n'ont généralement pas été détectées dans la matière première (farine de malt de sorgho) mais seulement dans les échantillons fermentés notamment la suspension intermédiaire et le culot ; ces espèces seraient associées à l'environnement créé par la fermentation en jarre en argile cuite. Par contre ces espèces n'ont pas été observées dans les échantillons de Samandin où *Lact. fermentum* a été la seule espèce dominante identifiée; cette situation résulterait de l'application dans ce site d'une procédure de lavage du matériel utilisant du savon et une solution de potasse locale après chaque production.

*Lact. fermentum* dénombrée dans le produit fini résulte d'une contamination car les mêmes jarres sont utilisées pour l'acidification et la fermentation alcoolique. La présence de *Lact. fermentum* dans le produit fini pourrait présenter un avantage pour la conservation du produit et la sécurité des consommateurs car certaines souches de bactéries lactiques ont des potentialités antimicrobiennes intéressantes et des effets probiotiques.

L'acidification du moût du *dolo* et du *pito* selon les procédés de brassage *Mossi* et *Dagarti*, constitue une étape séparée résultant d'une fermentation lactique naturelle non contrôlée où *Lact. fermentum* est l'espèce dominante impliquée (75-100% des isolats), associée à *Lact. delbrueckii* (5-26%) et *Ped. acidilactici* (6-13%). *Lact. fermentum* peut être sélectionnée comme culture starter et utilisée pour une fermentation contrôlée du moût du *dolo* et du *pito*. Les isolats ont montré une grande hétérogénéité génétique, de sorte que la sélection des souches de *Lact. fermentum* devra se faire sur la base de leur-biodiversité et leurs propriétés technologiques.

## **CHAPITRE IV**

**DETERMINATION DES PROPRIETES TECHNOLOGIQUES DES  
ISOLATS DE *LACTOBACILLUS FERMENTUM* IMPLIQUES DANS  
LA FERMENTATION NATURELLE DU MOÛT DU *DOLO* ET DU *PITO***

## Résumé :

Les propriétés technologiques d'isolats de *Lactobacillus fermentum*, espèce dominante responsable de la fermentation naturelle non contrôlée du moût du *dolo* et du *pito* ont été déterminées. 264 isolats de *Lact. fermentum* collectés à partir d'échantillons prélevés au cours du brassage traditionnel du *dolo* à Ouagadougou (Burkina Faso) et du *pito* à Tamale (Nord Ghana) ont été utilisés. L'activité antimicrobienne des isolats envers des indicateurs de germes pathogènes et leur capacité à acidifier l'extrait de malt de sorgho, à produire des polysaccharides exocellulaires (EPSs) et des amylases ont été déterminées. Une activité antimicrobienne a été détectée pour 33,3 %, 31,8%, 22,7% et 15,9% des isolats envers respectivement *Staphylococcus aureus* productrice d'entérotoxine A, *Staphylococcus aureus* productrice d'entérotoxines A et B, *Escherichia coli* et *Listeria innocua*. 12% des isolats ont révélé une activité antimicrobienne envers l'ensemble de ces quatre souches indicatrices de germes pathogènes. Quant au pouvoir acidifiant, une similarité a été observée entre les isolats qui se répartissent en quatre groupes selon leur taux d'acidification évalué en  $\Delta\text{pH}$  (pH au temps t - pH au temps t<sub>0</sub>): le groupe G1 constitué des isolats les plus acidifiants (43,48% des isolats testés) avec un taux d'acidification de  $1,14 \pm 0,15 \Delta\text{pH}$  en 6h de fermentation ; le groupe G2 (36,08% des isolats) avec un taux d'acidification de  $1,12 \pm 0,15 \Delta\text{pH}$  en 9h de fermentation ; le groupe G3 (15,65% des isolats) et le quatrième groupe G4 (4,78% des isolats) avec des taux d'acidification similaires de  $1,03 \pm 0,07 \Delta\text{pH}$ , respectivement en 12h et 15h de fermentation. Les isolats qui ont révélé une activité antimicrobienne, appartiennent aux groupes G1 (5,76%), G2 (40,38%) et G3 (36,53%). 88,7% des isolats ont montré une capacité à produire des polysaccharides exocellulaires (EPSs) et 15% ont révélé une faible activité amylasique.

Le rôle de *Lact. fermentum* dans le brassage traditionnel du *dolo* et du *pito* est de fermenter le moût en l'acidifiant et abaissant son pH, en produisant des acides organiques, des EPSs et des substances antimicrobiennes. L'abaissement du pH du moût est favorable à la fermentation alcoolique subséquente pour obtenir les produits finis (*dolo*, *pito*); les acides organiques, les EPSs et les substances antimicrobiennes contribuent au goût, à la texture et à la salubrité des produits finis. Des isolats possédant un bon pouvoir acidifiant (G1 et G2), une activité antimicrobienne intéressante et la capacité de produire des EPSs, présentent des potentialités pour être utilisés comme cultures starter pour une fermentation contrôlée du moût du *dolo*. L'utilisation de telles cultures starter contribuera à réduire la durée de la phase d'acidification du brassage et à améliorer le goût, la texture et la salubrité des produits finis.

**Mots clés:** *Lactobacillus fermentum*, propriétés technologiques, cultures starter, moût du *dolo* et du *pito*, bière de sorgho.

Les résultats ont été publiés dans la revue *Journal of Applied Microbiology*.

## **Introduction**

Le sorgho (*Sorghum bicolor* (L) Moench) contribue à l'alimentation des populations dans les régions tropicales d'Afrique et d'Asie. En Afrique de l'Ouest, les grains de sorgho sont transformés en malt de sorgho puis utilisés pour la production des bières traditionnelles comme le *dolo* et le *pito*, respectivement au Burkina Faso et au Ghana. Le brassage traditionnel du *dolo* et du *pito* est long et complexe avec comme principales opérations: le broyage du malt de sorgho, l'empâtage, l'acidification, la cuisson/concentration, le refroidissement et la fermentation alcoolique du moût final par addition de levure sèche issue de la production précédente (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007). *Saccharomyces cerevisiae* a été identifié comme l'espèce dominante de la levure sèche utilisée pour la fermentation alcoolique (van der Aa Kühle *et al.*, 2001; Glover *et al.*, 2005). Au Burkina Faso, le moût final est également consommé comme boisson non alcoolisée par la population et une partie est vendue par les productrices. Notre précédente étude a montré la prédominance de *Lactobacillus fermentum* parmi les espèces bactériennes responsables de l'acidification naturelle du moût du *dolo* et du *pito* (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007) qui se présente ainsi comme un candidat favori à la sélection de cultures starter. Les bactéries lactiques sont bien connues pour leur capacité à produire divers composés qui contribuent au goût, à la flaveur, à la couleur, à la texture, à la consistance, à la qualité nutritionnelle et à la sécurité sanitaire des produits fermentés (Davidson, 1997; Ayad *et al.*, 2004). L'objectif de la présente étude est de déterminer les propriétés technologiques des souches de *Lact. fermentum* isolées de la fermentation naturelle du moût du *dolo* et du *pito*, afin de servir de base à la sélection d'isolats performants comme cultures starter pour une fermentation contrôlée.

## **IV.1 Matériel et Méthodes**

### **IV.1.1 Origine des isolats de *Lactobacillus fermentum***

264 isolats de *Lact. fermentum* précédemment identifiés (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007), provenant de deux sites de production du *dolo* à Ouagadougou (Burkina Faso) à savoir Zone 1 (65 isolats) et Samandin (70 isolats) et de deux sites de production du *pito* à Tamale (Ghana) à savoir Tamale town (59 isolats) et Nyankpala (70 isolats) ont été utilisés. Les isolats, conservés à -80°C dans du glycérol à 50% (v/v), ont été revivifiés sur de la gélose MRS en anaérobiose, puis utilisés pour les expériences.

### **IV.1.2 Recherche de l'activité antimicrobienne des isolats de *Lact. fermentum***

La technique des essais en touches de Schillinger et Lücke (1989) avec de la gélose MRS modifiée contenant 0,2% (m/v) de glucose et 1,2% (m/v) d'agar en anaérobiose a été utilisée (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2008) afin de minimiser la production d'acide et de peroxyde d'hydrogène. *Staphylococcus aureus* productrice d'entérotoxine A, *Staphylococcus aureus* productrice d'entérotoxines A et B, *Escherichia coli* et *Listeria innocua* ATTC 33090 provenant de la collection de Faculty of Life Science, Department of Food Science Food Microbiology (University of Copenhagen) ont été utilisés comme indicateurs de germes pathogènes. La largeur de la zone d'inhibition a été mesurée (en mm) de la bordure de la colonie de *Lact. fermentum* testé à la limite supérieure de la zone d'inhibition.

### **IV.1.3 Détermination du pouvoir acidifiant des isolats de *Lact. fermentum***

Des essais de fermentation par inoculation en monoculture de chacune des souches testées, ont été réalisés à 37°C pendant 24h. L'extrait aqueux de malt de sorgho a été utilisé comme substrat ; l'évolution du pH a été suivie au cours de la fermentation et le taux d'acidification a été calculé en  $\Delta\text{pH}$  selon Ayad *et al.* (2004):  $\Delta\text{pH} = \text{pH au temps } t - \text{pH au temps } t_0$ . Les isolats ont été regroupés selon leur taux d'acidification et pour chaque groupe d'isolats, le taux d'acidification moyen et l'écart type ont été calculés. Les essais ont été réalisés en deux répétitions et à chaque répétition l'isolat est ensemencé en double.

### **IV.1.4 Recherche de la production de polysaccharides exocellulaires (EPSs) par les isolats**

La production de polysaccharides exocellulaires par les isolats a été mise en évidence par la méthode décrite par Guiraud (1998) ; l'aspect onctueux et filant des colonies qui traduit la présence des EPSs a été examiné par la technique à la anse (Knoshaug *et al.*, 2000). Les isolats

EPSs-positifs ont été confirmés en les cultivant à 30°C pendant 24h dans du bouillon MRS-saccharose sans glucose ni peptone (Pidou *et al.*, 1990); 1,5 ml de bouillon de culture a été centrifugé à 5000 g pendant 10 min à 4°C puis 1ml de surnageant a été transféré dans un tube à essai auquel un volume égal d'éthanol à 95°C refroidi à 4°C est ajouté. En présence des EPSs, il se forme un anneau opaque à l'interface. Les isolats EPSs-positifs ont été notés en fonction de l'intensité de l'anneau.

#### **IV.1.5 Recherche de l'activité amylasique des isolats de *Lact. fermentum***

La capacité des isolats à produire des amylases a été déterminée selon la méthode décrite par Sanni *et al.* (2002) en cultivant les isolats sur la gélose MRS modifiée contenant l'amidon comme seule source de carbone. L'hydrolyse de l'amidon qui traduit la production d'amylase par les isolats a été mise en évidence par la présence d'une zone claire autour des colonies après pulvérisation d'une solution de Lugol. La croissance des isolats sur la gélose MRS-amidon a été également notée comme une faible activité amylasique. Les isolats qui ont été capables de se développer sur cette gélose ont été ensuite cultivés sur les géloses MRS-amidon contenant du CaCl<sub>2</sub> et du CaCO<sub>3</sub>, dans l'objectif de stimuler la production d'amylase par les isolats (Giraud *et al.*, 1994).

## **IV.2 Résultats**

### **IV.2.1 L'activité antimicrobienne des isolats**

Des 264 isolats de *Lact. fermentum* examinés, 33,33% (88 isolats) ont montré un antagonisme envers *Staphylococcus aureus* productrice d'entérotoxine A, en inhibant la croissance de cette souche indicatrice avec des zones d'inhibition de 1 à 15 mm de large. 31,81% ont montré un antagonisme envers *Staph. aureus* productrice d'enterotoxines A + B avec des zones d'inhibition de 1 à 10 mm pour la plupart des cas. 22,72% et 15,9% des isolats ont inhibé respectivement la croissance de *E. coli* et *L. innocua*, avec des zones d'inhibition plus faibles de 1 à 5 mm (Tableau XVI). 12,12% des isolats examinés ont inhibé la croissance des quatre souches indicatrices de germes pathogènes utilisées. La figure 14 illustre l'inhibition de la croissance de *Staph. aureus* par des isolats de *Lact. fermentum*.

**Tableau XVI:** Activité antimicrobienne de 264 isolats de *Lactobacillus fermentum* envers des souches indicatrices de germes pathogènes

Souches indicatrices	Spectre d'inhibition des isolats de <i>Lact. fermentum</i> (n=264)				Pourcentage (%) des isolats ayant une activité antimicrobienne
	-	+	++	+++	
<i>Staph. aureus</i> productrice d'enterotoxine A	- (176)	+(28)	++(50)	+++ (10)	33,33 (88/264)
<i>Staph. aureus</i> productrice des enterotoxines A et B	- (180)	+ (45)	++(32)	+++ (7)	31,81 (84/264)
<i>E. coli</i>	- (204)	+ (60)	++(0)	+++ (0)	22,72 (60/264)
<i>L. innocua</i> ATTC 33090	-(222)	+(42)	++(0)	+++ (0)	15,9 (42/264)

-: aucune activité; +: activité positive avec des zones d'inhibition 1 à 5 mm de large; ++: activité positive avec des zones d'inhibition de 6 à 10 mm de large; +++: activité positive avec des zones d'inhibition de 11 à 15 mm de large; entre parenthèse: nombre d'isolats

Le Tableau XXIV (Annexe) donne la liste des souches de *Lact. fermentum* qui ont une propriété antimicrobienne.

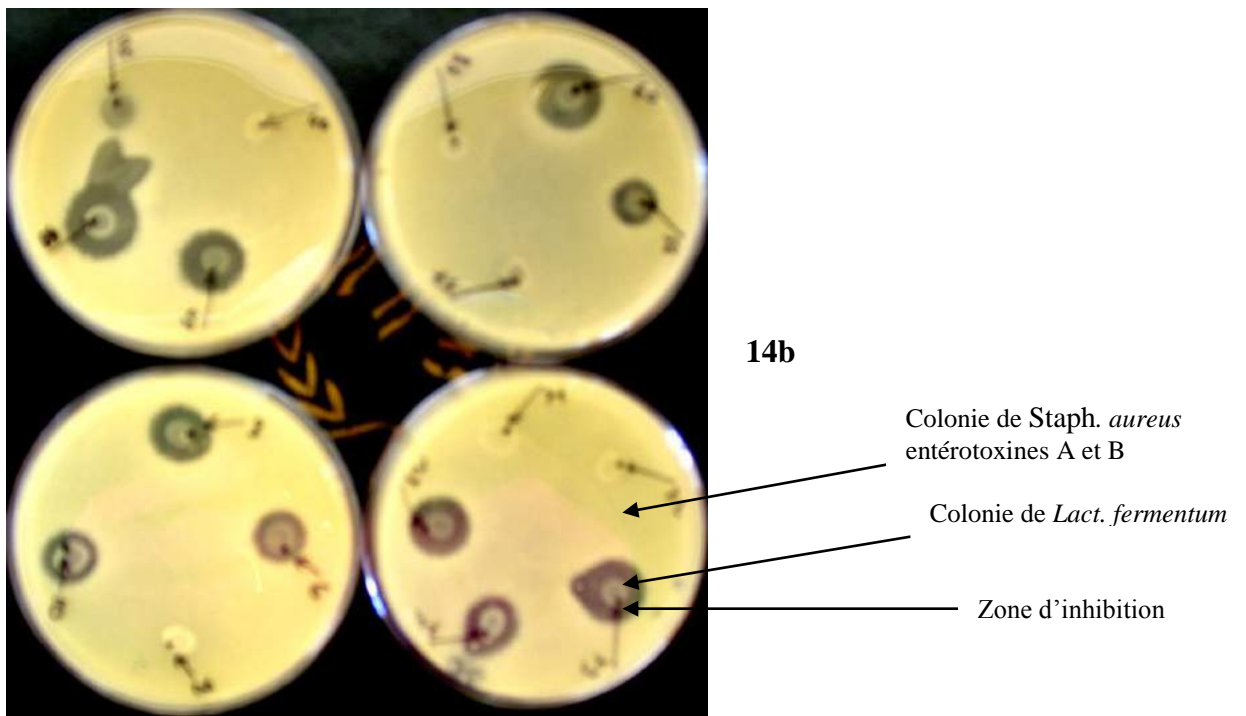
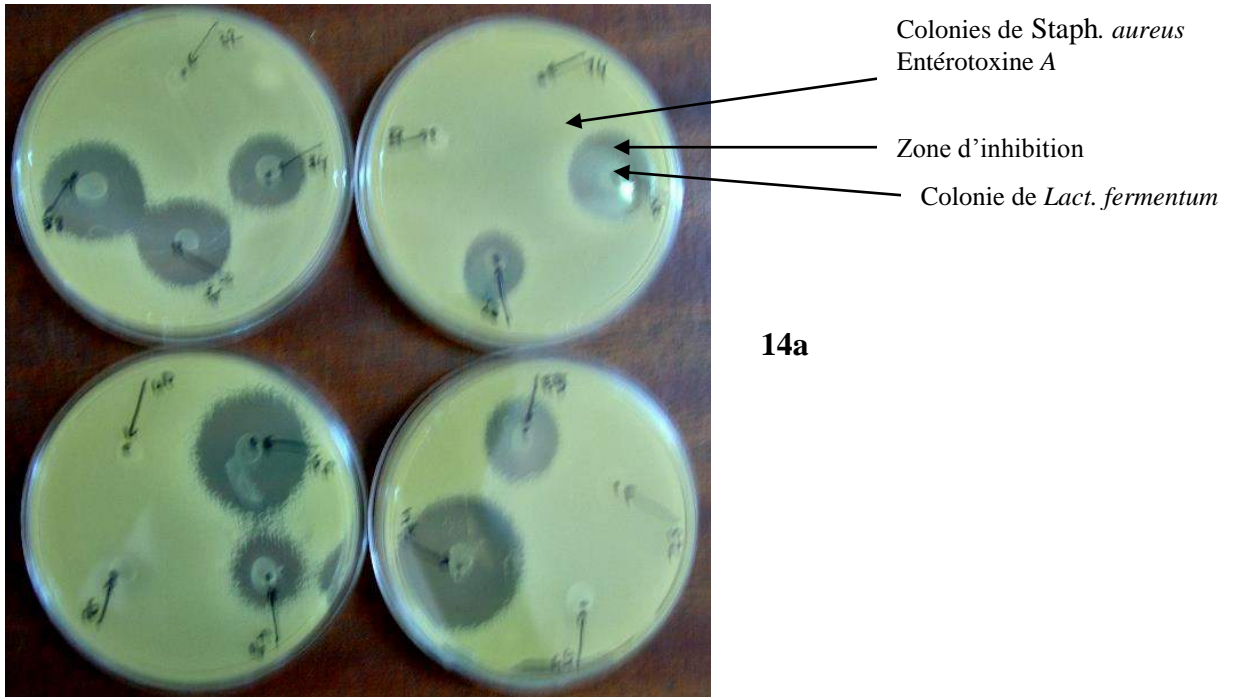
#### IV.2.2 Le pouvoir acidifiant des isolats de *Lact. fermentum*

Un total de 230 isolats comprenant les 88 isolats susmentionnés ont été utilisés pour la détermination du pouvoir acidifiant. Les résultats sont présentés par les Figures 15 (A à F). Aux différents temps d'échantillonnage de la fermentation de l'extrait de malt de sorgho, les isolats se sont regroupés selon leur taux d'acidification, calculé en  $\Delta$ pH.

Au temps t3h (Fig. 15A) les 230 isolats ont formé 8 groupes avec des taux d'acidification allant de 0,03  $\Delta$ pH (40 isolats) à 0,67  $\Delta$ pH (2 isolats, SF9.2 et SF7.12 provenant de Samandin); le plus grand groupe comprend 78 isolats avec un taux d'acidification moyen de  $0,09 \pm 0,03$   $\Delta$ pH.

Au temps t6h (Fig. 15B), 14 groupes d'isolats ont été observés avec des taux d'acidification variant de  $0,1 \pm 0,02$   $\Delta$ pH (16 isolats) à  $1,38 \pm 0,02$   $\Delta$ pH [10 isolats dont 2 isolats de Tamale (TSA1 et TSB13) et 8 isolats de Samandin (SF7.12, SF9.2, Sd10.10, Sd7.6b, SF6.4, SF6.10, Sd5.5 et SF6.6)]. On remarque dès 6h de fermentation la particularité des isolats de Samandin pour ce qui concerne leur pouvoir acidifiant. Deux grands groupes ont été observés et contiennent 36 et 26 isolats avec des taux d'acidification moyens respectifs de  $0,98 \pm 0,03$   $\Delta$ pH et  $1,09 \pm 0,03$   $\Delta$ pH.





**Fig 14:** Inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* productrice d'entérotoxine A (14a) et *Staphylococcus aureus* productrice d'entérotoxines A et B (14b) par des isolats de *Lact. fermentum*

La Figure 15C illustre le regroupement des isolats en 9h de fermentation avec des taux d'acidification allant de  $0,38 \pm 0,01 \Delta\text{pH}$  à  $1,67 \pm 0,01 \Delta\text{pH}$ ; deux grands groupes d'isolats ont été observés avec des taux d'acidification moyens de  $0,98 \pm 0,03 \Delta\text{pH}$  (38 isolats) et  $1,61 \pm 0,03 \Delta\text{pH}$  (40 isolats).

La Figure 15D montre le regroupement des isolats en 12h de fermentation; 11 groupes ont été observés avec des taux d'acidification allant de  $0,73 \pm 0,01 \Delta\text{pH}$  (5 isolats) à  $1,77 \pm 0,01 \Delta\text{pH}$  (2 isolats); peu d'isolats ont eu des taux d'acidification inférieurs à  $0,99 \pm 0,03 \Delta\text{pH}$ .

En 15h de fermentation, aucun isolat n'a eu un taux d'acidification inférieur à  $0,98 \pm 0,02 \Delta\text{pH}$  (Fig. 15E). Des résultats similaires ont été enregistrés en 24h de fermentation avec des taux d'acidification allant de  $1,01 \pm 0,01$  à  $1,96 \pm 0,01 \Delta\text{pH}$  (Fig. 15F).

Le pH du moût obtenu par fermentation naturelle dans le brassage traditionnel est de l'ordre de 3,5-3,8 (nos travaux précédents); cet intervalle de valeurs a été pris comme référence pour analyser les propriétés acidifiantes des isolats.

Ainsi, en 3h de fermentation, aucun isolat n'a montré un taux d'acidification  $\geq 0,94$  nécessaire pour enregistrer un pH compris dans cet intervalle de valeurs (Fig. 15A).

En 6h de fermentation, 43,48% des isolats (100 isolats) ont montré des taux d'acidification  $\geq 0,98 \pm 0,03 \Delta\text{pH}$ , (Fig.15B, Tableau XVII); ces isolats qui ont permis d'atteindre le pH requis du moût en 6h de fermentation, ont été identifiés comme les plus rapides du point de vue du pouvoir acidifiant et ont formé le premier groupe d'isolats (G1).

En 9h de fermentation, un total de 183 isolats ont eu des taux d'acidification  $\geq 0,98 \pm 0,03 \Delta\text{pH}$  dont 83 nouveaux isolats (36,08%) comparés à l'étape précédente (Fig.15C, Tableau XVII); ces isolats forment le second groupe d'isolats (G2).

En 12h de fermentation, un troisième groupe (G3) a été obtenu avec 36 isolats (15,65%), puis un quatrième groupe (G4) avec 11 isolats (4,78%) en 15h de fermentation.

L'évolution des taux d'acidification moyens de chacun des quatre groupes au cours du temps de fermentation de l'extrait de malt de sorgho est illustrée par la Figure 16. Pour les isolats du groupe G1, les taux d'acidification moyens ont été de  $0,38 \pm 0,09$ ,  $1,14 \pm 0,15$ ,  $1,49 \pm 0,14$  et  $1,57 \pm 0,13 \Delta\text{pH}$  respectivement en 3h, 6h, 9h et 12h de fermentation (Fig. 16). Pour les isolats du groupe G2 le taux d'acidification moyen a évolué de  $0,11 \pm 0,07$ ,  $0,58 \pm 0,11$ ,  $1,12 \pm 0,15$ , et  $1,27 \pm 0,14 \Delta\text{pH}$  respectivement en 3h, 6h, 9h et 12h. Pour les isolats du groupe G3, il a par contre évolué de  $0,11 \pm 0,07$ ,  $0,58 \pm 0,11$ ,  $1,03 \pm 0,15$ , et  $1,27 \pm 0,14 \Delta\text{pH}$  respectivement en 6h, 9h, 12h et 15h; pour les mêmes temps de fermentation respectifs, l'évolution du taux d'acidification moyen des isolats du groupe G4 a été de  $0,15 \pm 0,09$ ,  $0,47 \pm 0,13$ ,  $0,77 \pm 0,09$  et  $1,03 \pm 0,07 \Delta\text{pH}$  (Fig.16).

**Tableau XVII:** Répartition de 230 isolats of *Lactobacillus fermentum* selon leur activité acidifiante durant les essais de fermentation de l'extrait de malt de sorgho, pH  $4,89 \pm 0,20$ .

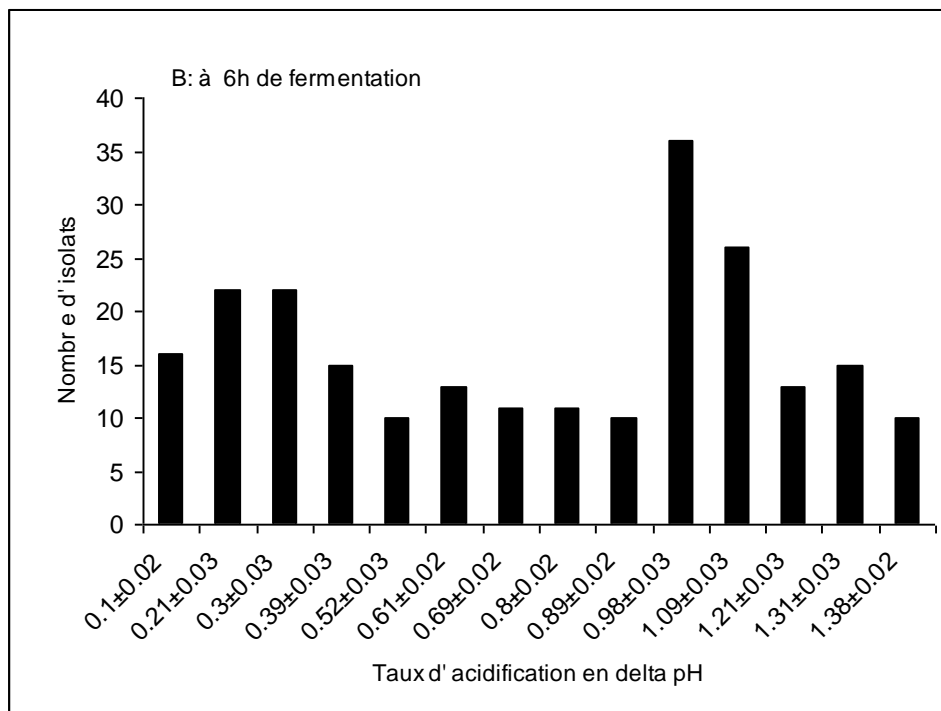
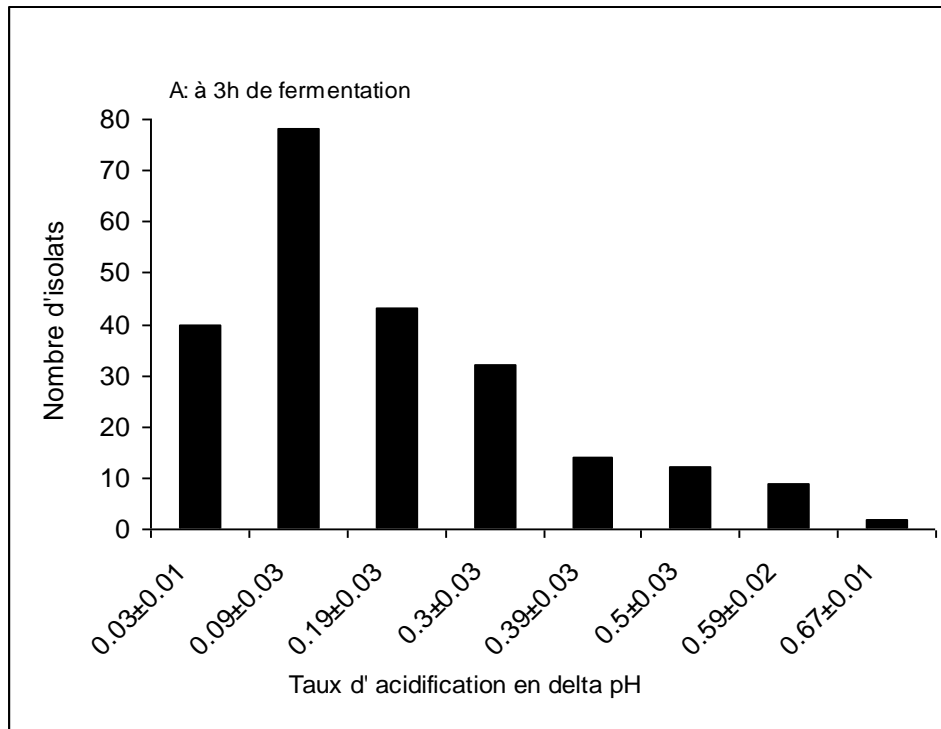
Temps de fermentation	Nombre total d'isolats ayant des taux d'acidification $\geq 0,94 \Delta\text{pH}$	Nombre de nouveaux isolats ayant des taux d'acidification $\geq 0,94 \Delta\text{pH}$ comparé à l'étape précédent d'échantillonnage	
		Nombre	Pourcentage (%)
3h	0	0	0
6h	100	100 (1 <sup>er</sup> groupe d'isolats, G1)**	43,48
9h	183	83 (2 <sup>ème</sup> groupe d'isolats, G2)	36,08
12h	219	36 (3 <sup>ème</sup> groupe d'isolats, G3)	15,65
15h	230	11 (4 <sup>ème</sup> groupe d'isolats, G4)	4,78
24h	230	0	0

\*: le taux d'acidification a été calculé en  $\Delta\text{pH}$  (pH au temps t - pH au temps t0) et des taux d'acidification  $\geq 0,94 \Delta\text{pH}$

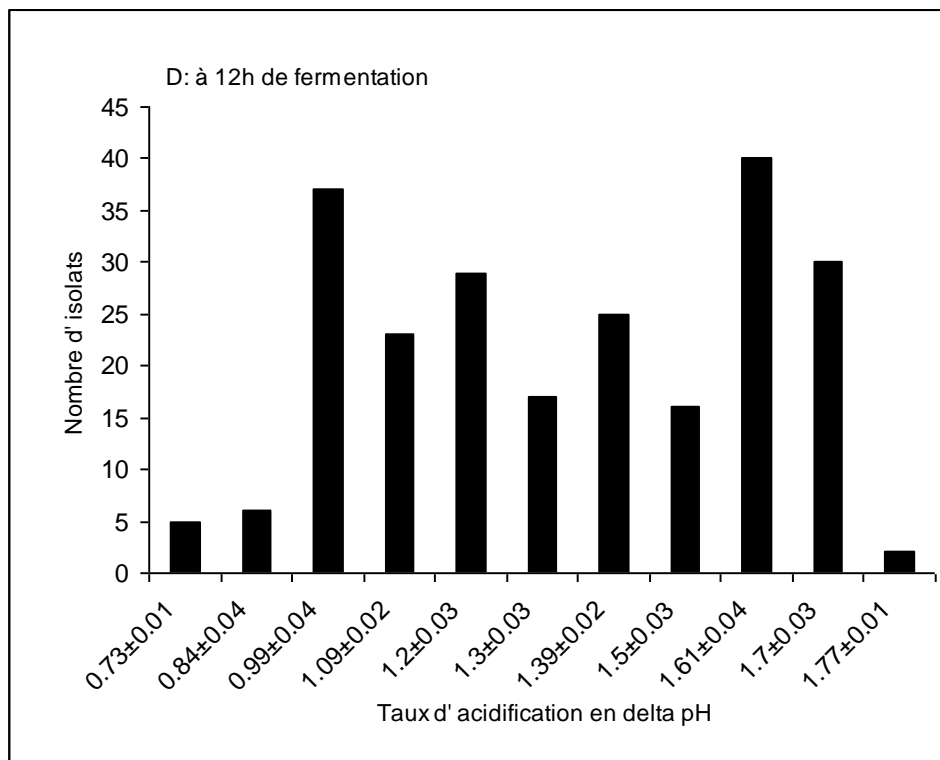
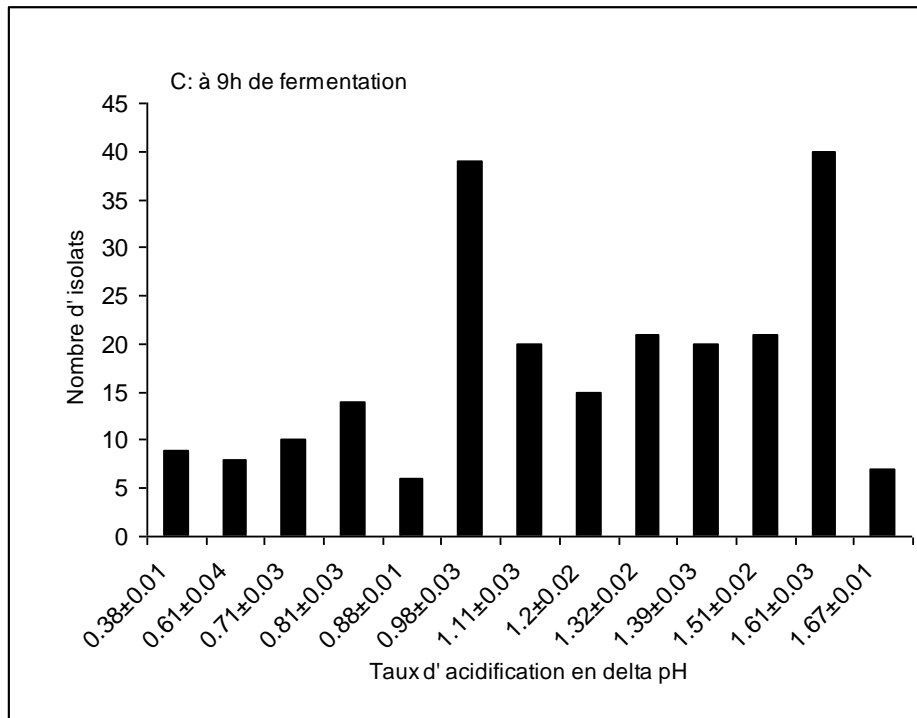
correspondent à des pH de 3,5-3,8 des extraits fermentés; \*\*: entre parenthèses, les groupes d'isolats selon leur activité acidifiante.

La distribution des isolats en fonction de leur origine et de leur pouvoir acidifiant a montré que le groupe G1 qui forme les isolats les plus acidifiants est composé par ordre d'importance des isolats de Samandin (40), de Tamale town (31), de Nyankpala (28) puis de Zone 1 (1) (Fig.17). Le groupe G2 est constitué d'isolats provenant des quatre sites de production Zone 1 (19), Samandin (23), Tamale town (13) et Nyankpala (28). Les groupes G3 et G4 sont par contre principalement constitués d'isolats de Zone 1 (24 et 10 respectivement). Les isolats de Zone 1 apparaissent donc les moins acidifiants comparés aux autres; ceux de Samandin sont les plus acidifiants. Les isolats qui ont révélé une activité antimicrobienne appartiennent par ordre d'importance aux groupes G2 (43 isolats), G3 (23 isolats), G1 (16 isolats) et G4 (6 isolats). Le Tableau XXIII (Annexe) donne la liste des souches de *Lact. fermentum* en fonction des groupes G1, G2, G3 et G4 (pouvoir acidifiant).

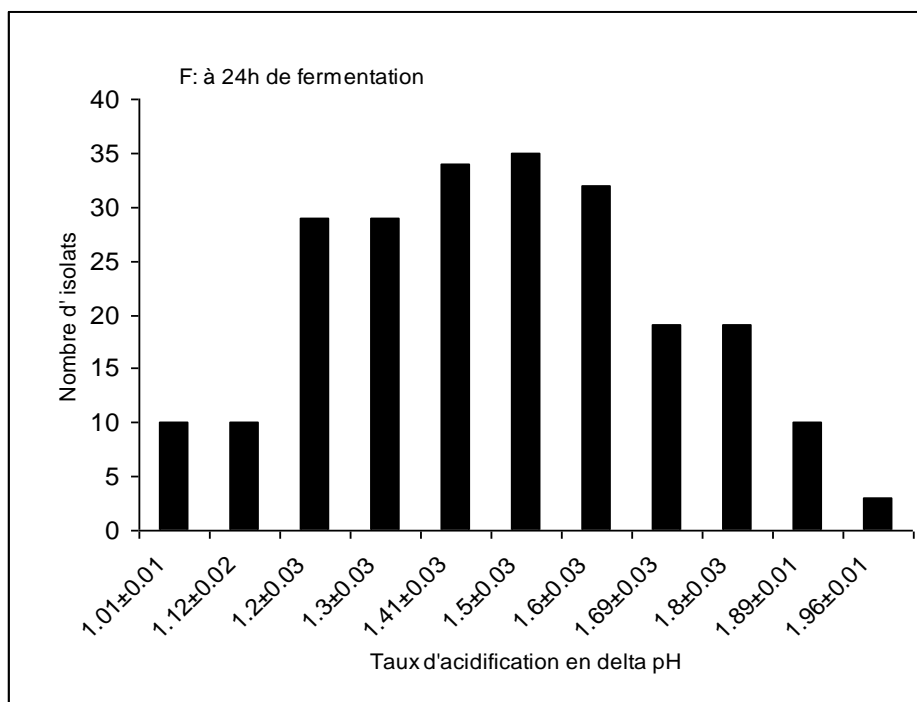
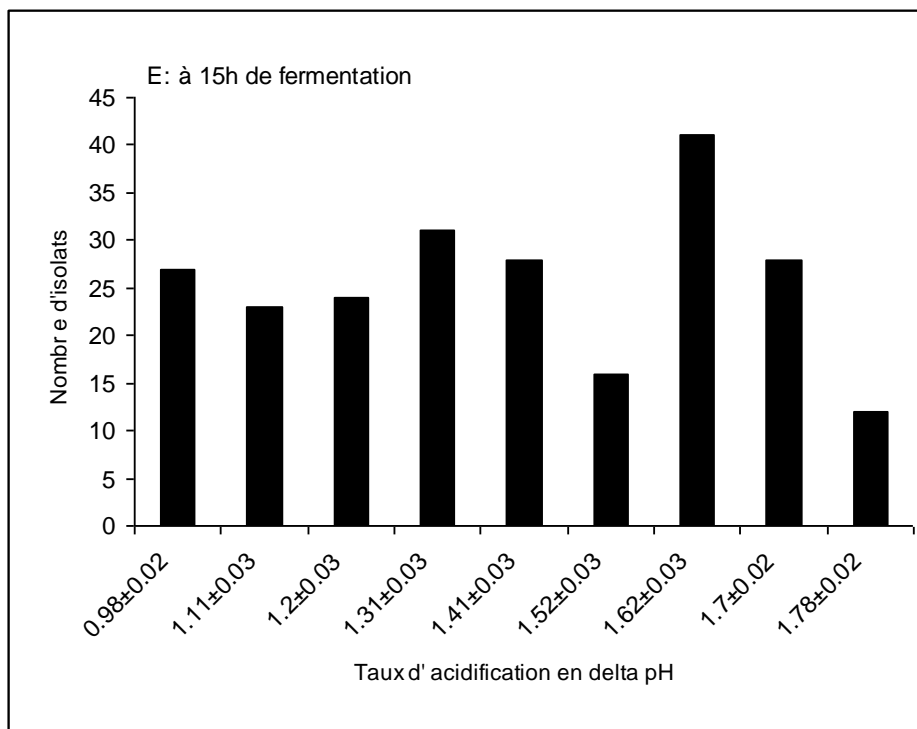
Ainsi, à partir d'extraits de farine de malt de sorgho avec un pH initial de  $4,89 \pm 0,20$ , inoculés avec des isolats de *Lact. fermentum* en monoculture, des pH de l'ordre de 3,5-3,8 ont été enregistrés en 6h, 9h, 12h et 15h de fermentation avec respectivement les isolats du groupe G1, G2, G3 et G4. Ces résultats démontrent une faible diversité des isolats vis-à-vis du pouvoir acidifiant. La durée de l'acidification naturelle du moût du dolo dans le brassage traditionnel qui dure 12-16h selon les sites, peut donc être ramener à 6-9h par la conduite d'une fermentation contrôlée avec des isolats ayant un bon pouvoir acidifiant notamment ceux des groupes G1 et G2.



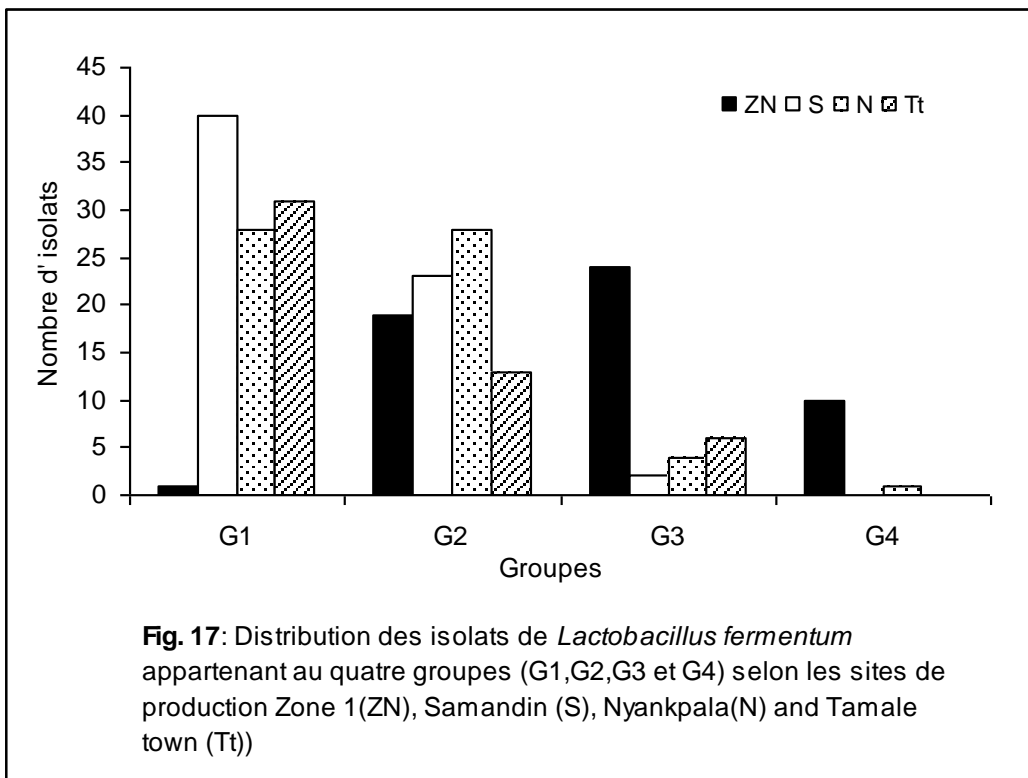
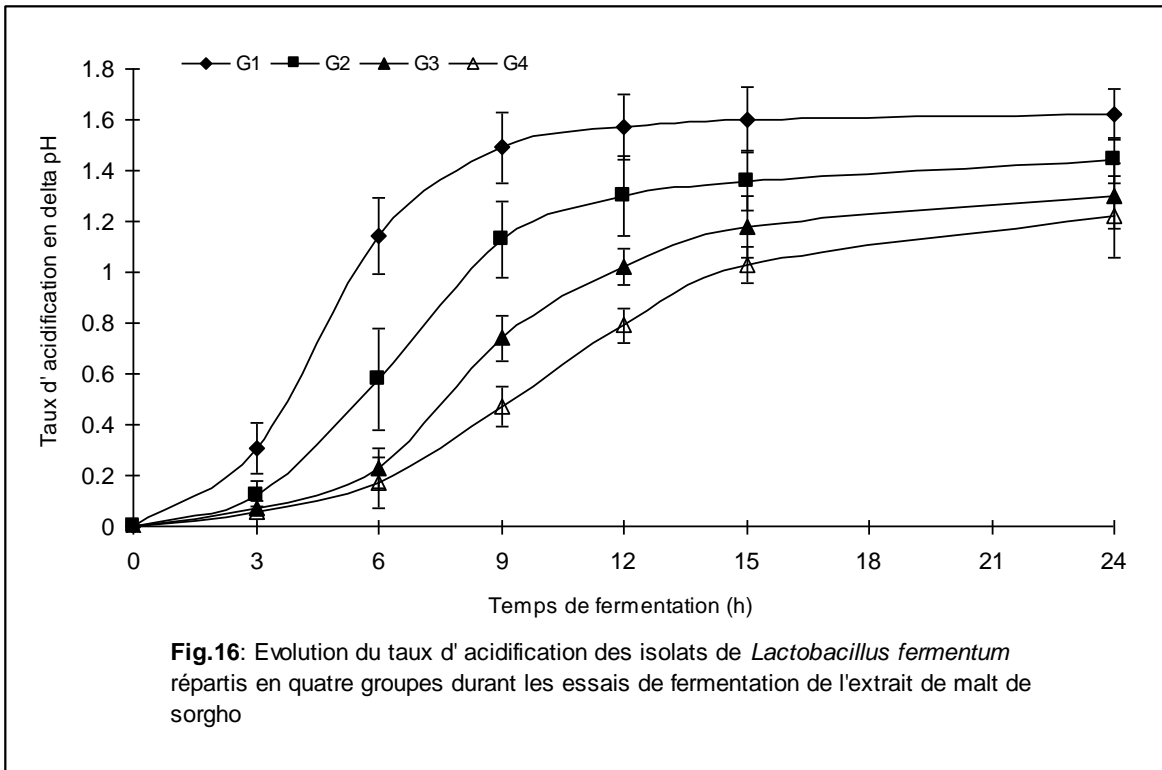
**Fig 15 (A&B)** : Distribution des isolats de *Lactobacillus fermentum* à 3h (A) et à 6h (B) de fermentation pendant les essais de fermentation de l'extrait de malt de sorgho



**Fig 15 (C&D) :** Distribution des isolats de *Lactobacillus fermentum* à 9h (C) et à 12h (D) de fermentation pendant les essais de fermentation de l'extrait de malt de sorgho



**Fig 15 (E&F)** : Distribution des isolats de *Lactobacillus fermentum* à 15h (E) et à 24h (F) de fermentation pendant les essais de fermentation de l'extrait de malt de sorgho.



### **IV.2.3 La capacité des isolats de *Lact. fermentum* à produire des polysaccharides exocellulaires (EPSs)**

Le screening a révélé que 88,7% des 230 isolats testés sont capables de produire des EPSs dans les conditions précédemment décrites. 17,82% des isolats (41/230) ont une bonne production de EPSs, 42,61% une production moyenne et 28,26% une faible production.

### **IV.2.4 La capacité des isolats de *Lact. fermentum* à produire des amylases**

Il convient de signaler ici qu'un halo entourant les isolats amylase-positifs n'a pas été observé pour les isolats testés comme cela a été le cas pour la souche témoin positif qui a montré un halo de 2 mm. Cependant, la capacité de certains isolats testés à se développer sur le milieu MRS modifié contenant l'amidon comme seule source de carbone révèle une faible activité amylasique de ces derniers. Ainsi, 84,78% des isolats (195/230) ont été amylase-négatifs; 15,22% des isolats ont été capables de croître sur la gélose MRS modifiée contenant l'amidon comme seule source de carbone. Ces isolats ont été capables d'utiliser l'amidon pour se développer, ce qui révèle leur faible activité amylasique. L'addition du  $\text{CaCl}_2$  et du  $\text{CaCO}_3$  pour stimuler la synthèse d'amylase par les isolats n'a pas amélioré leur performance.

La liste des souches de *Lact. fermentum* qui ont des propriétés technologiques intéressantes est présentée dans le Tableau XXIV (Annexe).

## **IV.3 Discussion**

Cette étude a permis de déterminer le rôle de *Lact. fermentum* dans la technologie de brassage traditionnel du *dolo* et du *pito*, deux bières de sorgho Ouest Africaines. Les résultats ont révélé qu'une proportion intéressante des isolats de *Lact. fermentum* ont la capacité d'inhiber la croissance de *Staph. aureus*, *E. coli* et *L. innocua* utilisés comme indicateurs de germes pathogènes. L'inhibition a été importante pour *Staph. aureus* mais faible pour *E. coli* et *L. innocua*. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Lei et Jakobsen (2004). Des travaux antérieurs ont aussi rapporté une activité antimicrobienne de bactéries lactiques isolées de produits fermentés Africains (Mensah *et al.*, 1991; Simango et Rukure, 1992; Halm *et al.*, 1993; Olsen *et al.*, 1995). L'activité antimicrobienne des isolats a été déterminée dans des conditions appropriées qui permettent de minimiser la production d'acide et de peroxyde d'hydrogène, afin que l'inhibition soit due à d'autres composés comme les bactériocines (Schillinger et Lücke, 1989). Dans cette optique, une souche de *Lact. fermentum* a été décelée productrice d'une bactériocine (Fermentcin B) stable à 100°C pendant 30 min à pH 3,0-8,0 (Yan et Lee, 1997). De



même Savadogo et collaborateurs (2004) ont rapporté la production de bactériocine par une souche de *Lact. fermentum* isolée de lait fermenté au Burkina Faso inhibant la croissance de *Staph. aureus* ATCC 25293 et *E. coli* 105182 CIP. Une production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de bactériocine par des bactéries lactiques hétérofermentaires isolées du manioc fermenté dont *Lact. fermentum*, a également été mise en évidence (Kostinek *et al.*, 2005). Les propriétés antimicrobiennes des cultures starter sont importantes pour la sécurité des consommateurs.

La faible diversité observée au niveau des isolats quant à leur pouvoir acidifiant permet de dire que l'acidification reste leur principal rôle dans la technologie de production du *dolo*. *Lact. fermentum* acidifie le moût du *dolo* en abaissant son pH, condition favorable à la croissance des levures et à la fermentation alcoolique. L'abaissement du pH qui est une caractéristique essentielle de la fermentation lactique de substrats riches en sucres, a été largement mis en évidence au cours de la fermentation naturelle de produits alimentaires à base de céréales où *Lact. fermentum* est impliquée (Sulma *et al.*, 1991; Halm *et al.*, 1993, Hounhouigan *et al.*, 1993b; Olsen *et al.*, 1995; Lei et Jakobsen, 2004). *Lact. fermentum* Ogi E1, une souche amylolytique isolée de la pâte de maïs fermentée est acide tolérant, bien adaptée aux conditions acides qui se développent durant la fermentation naturelle des pâtes de céréales (Calderon Santoyo *et al.*, 2003). Cette tolérance à l'acide peut expliquer la prédominance de *Lact. fermentum* dans plusieurs pâtes fermentées traditionnelles Africaines.

La plupart de nos isolats de *Lact. fermentum* ont été capables de produire des EPSs. Les EPSs produits par les bactéries lactiques peuvent être sous forme de capsules fixées à la cellule bactérienne, ou excrétés sous forme de substance mucilagineuse (Sutherland, 1977; Cerning, 1990). Les espèces du genre *Lactobacillus* déjà identifiées pour la production des EPSs sont entre autres *Lact. hilgardii*, *Lact. paracasei*, *Lact. helveticus*, *Lact. delbrueckii*, *Lact. acidophilus*, *Lact. kefiranofaciens*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. casei*, *Lact. sakei*, *Lact. plantarum* et *Lact. brevis* (Pidoux *et al.*, 1990; De Vuyst *et al.*, 2001; Tallon *et al.*, 2003; Martensson *et al.*, 2003). Des souches de *Lact. fermentum* isolées de produits laitiers fermentés ont également été identifiées comme productrices des EPSs (Ayad *et al.*, 2004). Les EPSs produits par les bactéries lactiques peuvent agir dans les aliments comme des agents épaississants, stabilisants, émulsifiants, gélifiants ou fixateurs d'eau (van den Berg *et al.*, 1995; De Vuyst *et al.*, 2001) et peuvent de ce fait jouer un rôle important dans le comportement rhéologique et la texture des produits alimentaires (Sikkema and Oba, 1998; de Vuyst and Degeest, 1999). Ces fonctions peuvent être appliquées au moût du *dolo* et du *pito* avec un impact certain sur le produit fini. Cette propriété semble être importante pour les isolats de *Lact. fermentum* responsables de la fermentation du moût du *dolo* et du *pito*.

Par contre nos isolats n'ont pas la capacité de produire des amylases, mis à part quelques isolats qui ont montré une faible activité amylasique, juste pour survivre sur la gélose MRS modifié contenant de l'amidon comme seule source de carbone. Ce résultat vient confirmer nos résultats précédents sur la fermentation de l'amidon avec les kits API 50 CHL, pour lesquels une réaction négative a été enregistrée avec tous les isolats de *Lact. fermentum* (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007). Cette faible activité amylasique des isolats résulterait de la nature du substrat utilisé pour la production du *dolo* (malt de sorgho) qui contient non seulement des sucres fermentescibles directement utilisables par les isolats, mais également des amylases endogènes générées pendant la germination des grains de sorgho (Traore *et al.*, 2004). A notre connaissance, une grande prévalence des souches de *Lact. fermentum* amylase-positives n'a pas été rapportée récemment. Très peu de souches de *Lact. fermentum* amylase-positives ont été isolées à partir de produits fermentés à base de maïs et de manioc (Agati *et al.*, 1998; Sanni *et al.*, 2002). Kostinek et ses collaborateurs (2005) n'ont également pas identifié des souches amylase-positives parmi les bactéries lactiques isolées du manioc fermenté. Les autres composés formés par les bactéries lactiques au cours de la fermentation de produits céréaliers sont les composés aromatiques, lesquels contribuent au goût et à la saveur des produits fermentés (Halm *et al.*, 1993, Annan *et al.*, 2003), et ceci peut également s'appliquer au moût du *dolo* et du *pito*.

Le rôle majeur des isolats de *Lact. fermentum* dans la technologie du *dolo* et du *pito* est de fermenter le moût en produisant des acides organiques et abaissant son pH, en produisant des substances antimicrobiennes, des polysaccharides exocellulaires (EPSs) et des composés aromatiques. Le pouvoir acidifiant des isolats, leur activité antimicrobienne et leur capacité à produire des EPSs devront être considérés pour la sélection des souches comme cultures starter, afin de prendre en compte les aspects technologiques et sécurité sanitaire. Comme indiqué à l'introduction, le moût final est consommé comme boisson non alcoolisée par la population; la promotion de cette boisson par l'utilisation de cultures starter présente plus d'avantages pour le conditionnement, la durée de conservation et la sécurité des consommateurs. La conduite d'une fermentation lactique contrôlée du moût du *dolo* et du *pito* par inoculation de souches sélectionnées devrait améliorer le brassage traditionnel en réduisant la durée de la fermentation lactique et en améliorant la qualité des produits finis. Le chapitre suivant traite de l'expérimentation de souches de *Lact. fermentum* comme cultures starter dans la production du *dolo*, notamment la fermentation lactique du moût.

**CHAPITRE V**

**UTILISATION DE SOUCHES SELECTIONNEES DE**  
***LACTOBACILLUS FERMENTUM* ET UN ISOLAT DE LEVURE**  
**COMME CULTURES STARTER DANS LA PRODUCTION DU *DOLO***

## Résumé :

Quatre souches de *Lact. fermentum* (ZN4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8) utilisées en monoculture et un isolat de levure (L4) ont été testés comme cultures starter dans la production du *dolo* au laboratoire et en unité de production. Les essais ont été réalisés selon la méthode de brassage traditionnel qui comporte une double fermentation lactique et alcoolique du moût, puis selon une co-fermentation lactique et alcoolique du moût. Lesensemencements ont été faits à 1% (v/v) d'inoculum de *Lact. fermentum* ZN4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8 pour la fermentation lactique et à 0,5% (v/v) d'inoculum de levure L4 pour la fermentation alcoolique. Le pH et la biomasse microbienne ont été suivis et les échantillons de *dolo* ont été soumis à l'appréciation d'un panel de dégustateurs. Les concentrations en cellules viables des inocula ont été de l'ordre de 9 log ufc/ml pour les souches de *Lact. fermentum* et 7 log ufc/ml pour la levure L4. Pendant la co-fermentation, la biomasse des 4 souches de *Lact. fermentum* a augmenté de 5,76-6,08 log ufc/ml (0h) à 8,76-9,11 log ufc/ml, 9,23-9,59 log ufc/ml et 9,34-9,82 log ufc/ml respectivement en 9h, 12h et 24h de co-fermentation; celle de la levure L4 a évolué de 4,92-5,04 log ucf/ml (0h) à 6,25-6,75 log ufc/ml, 6,98- 7,34 log ufc/ml, à 7,11-7,5 log ufc/ml respectivement en 9h, 12h et 24 h ; parallèlement le pH du substrat a baissé de 4,8 (0h) à 3,74 - 4,05 (9h), 3,68-3,75 (12h) puis 3,43-3,55 en 24h de co-fermentation. Pour les essais réalisés selon le brassage traditionnel, la biomasse de *Lact. fermentum* a évolué de 5,94-6,41 log ufc/ml en début de fermentation lactique du moût à 8,50-9,17 log ufc/ml, 9,28-9,46 log ufc/ml et 9,36-9,76 log ufc/ml respectivement en 9h, 12h et 24h, avec une baisse simultanée du pH de 4,86 (0h) à 3,62-3,94 (9h), 3,52-3,67 (12h) et 3,40-3,51 (24h). Quant à la fermentation alcoolique du moût acidifié, elle a été marquée par un développement de la levure L4 avec des concentrations cellulaires de 5,17-5,28 log ufc/ml (0h) à 6,94-7,08 log ufc/ml en 9h, puis 7,62-7,79 log ufc/ml en 12h de fermentation. Les essais réalisés en unité de production ont donné des résultats comparables à ceux du laboratoire. Les échantillons de *dolo* obtenus ont présenté des caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques comparables à celles du *dolo* traditionnel et ont été jugés acceptables par le panel de dégustateurs. Les cultures starter de *Lact. fermentum* ont permis de réaliser la fermentation lactique du moût en 9h en unité de production au lieu de 12-16h, durée de la fermentation lactique naturelle dans le procédé traditionnel. En culture mixte, les souches de *Lact. fermentum* et la levure L4 ont permis de produire du *dolo* en 12h de co-fermentation au lieu de 21-48h, durées des fermentations lactique et alcoolique dans le procédé traditionnel. L'utilisation des cultures starter contribue à réduire de manière significative la durée de production. L'utilisation de cultures starter de *Lact. fermentum* dans la production du *dolo* peut être envisagée à l'échelle pilote.

**Mots clés:** Bière de sorgho, *dolo*, fermentation, cultures starter, *Lactobacillus fermentum*, levure.

Ces résultats ont l'objet d'article publié dans la Revue Burkinabè de la Recherche *Science et Technique, série Sciences Appliquées et Technologies* (2008) Vol. 2 (1&2), 61-84.

## Introduction

Le sorgho est la céréale la plus répandue dans les zones tropicales arides et semi-arides d'Afrique et d'Asie, où il contribue pour plus de 70 % à l'alimentation des populations (Hulse *et al.*, 1980). Le sorgho a été utilisé depuis des siècles pour le brassage de la bière traditionnelle en Afrique (Novellie, 1977) où plus de la moitié de sa production est utilisée pour la fabrication de cette boisson (Rubayiza, 1998). La fabrication des bières traditionnelles reste une des principales utilisations du sorgho en Afrique. Les bières traditionnelles ou bières de sorgho sont les boissons fermentées les plus répandues en Afrique de l'Ouest. C'est le cas du *dolo*, du *pito* et bien d'autres boissons similaires produites et consommées au Burkina Faso, au Mali, au Ghana, au Togo, au Bénin, en Côte d'Ivoire et au Nigéria. Les bières de sorgho tout comme les autres aliments fermentés d'Afrique sont essentiellement issues de technologies traditionnelles basées sur une fermentation naturelle non contrôlée; les microorganismes impliqués proviennent du substrat, du matériel utilisé et de l'environnement de production. Cette méthode de fermentation présente des inconvénients notamment un faible rendement, une variabilité de la qualité et de la stabilité des produits finis, des risques de contamination par des microorganismes et/ou des métabolites indésirables (Motarjemi, 2002). Le développement de cultures starter dans les unités artisanales et l'application des bonnes pratiques d'hygiène, constituent une approche appréciable pour contrôler et optimiser les conditions de fermentation, puis contribuer de manière significative à l'amélioration de ces technologies traditionnelles (Sanni, 1993; Holzapfel, 2002; Rolle and Satin, 2002; Achi, 2005). L'utilisation de cultures starter impliquant des bactéries lactiques a été expérimentée dans la production de produits fermentés africains comme par exemple le *gari* (Ofuya et Nnajofofor, 1989), le *fufu* (Oyewole, 1990), le *kenkey* (Halm *et al.*, 1996), le *Kivunde* (Kimaryo *et al.*, 2000), le *togwa* (Mugula *et al.*, 2003), le *gowé* (Viéra-Dalodé *et al.*, 2008). L'utilisation de souches de *Lactobacillus spp.* comme cultures starter en brasserie moderne pour la fabrication des bières de fermentation lactique est bien connue dans les pays développés (Hammes *et al.*, 1992). En Afrique du Sud, une souche thermophile de *Lactobacillus delbrueckii* a été expérimentée dans l'acidification de la bière de sorgho (Haggblade and Holzapfel, 1989). Des essais de brassage du *pito* Nigérian en laboratoire ont été réalisés avec des

cultures starter constituées d'une combinaison de *Lactobacillus plantarum* et *Saccharomyces cerevisiae*, de *Pediococcus halophilus* et *Candida tropicalis* (Orji *et al.*, 2003).

Le brassage traditionnel du *dolo* à partir du malt de sorgho comporte deux fermentations: une fermentation lactique naturelle du moût qui dure 12-16h puis une fermentation alcoolique du moût acidifié qui dure 9-12h (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007). En général, la fermentation alcoolique des bières traditionnelles met déjà en pratique l'utilisation de culture starter de levure, ce qui n'est pas le cas pour la fermentation lactique non contrôlée. Ainsi, la fermentation alcoolique est conduite soit par l'addition de levure locale provenant de la production précédente, soit par la pratique de la technique de « pieds de cuve ». Selon Holzapfel (2002), ces pratiques combinées à l'utilisation répétée du même matériel limitent les risques d'accidents de fabrication et favorisent la sélection de souches mieux adaptées ayant des caractéristiques spécifiques intéressantes. Nos précédents travaux ont mis en évidence une fermentation lactique naturelle dans le brassage traditionnel du *dolo* et du *pito* avec *Lactobacillus fermentum* comme espèce dominante impliquée (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007). Pour ce qui concerne la fermentation alcoolique, *Saccharomyces cerevisiae* a été identifié comme espèce dominante de la levure locale (van der Aa Kühle *et al.*, 2001; Glover *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'étude des propriétés technologiques des isolats de *Lactobacillus fermentum* responsables de la fermentation naturelle du moût du *dolo* et du *pito*, a révélé des propriétés intéressantes pour certaines souches qui peuvent être utilisées comme cultures starter pour une fermentation lactique contrôlée du moût (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2008).

L'objectif du présent travail est d'expérimenter l'utilisation de souches sélectionnées de *Lactobacillus fermentum* pour une fermentation contrôlée par inoculation du moût, au laboratoire et en unité de production du *dolo* (milieu réel), afin d'évaluer la faisabilité.

## V.1 Matériel et Méthodes

Trois séries d'essais de production de *dolo* ont été réalisées:

- la première série a été réalisée au laboratoire, et a consisté en l'adaptation de la méthode traditionnelle de brassage du *dolo* avec une fermentation lactique contrôlée du moût par inoculation de souches sélectionnées de *Lactobacillus fermentum*, suivie d'une fermentation alcoolique contrôlée du moût acidifié par inoculation d'un isolat de levure;
- la deuxième série, également réalisée au laboratoire a consisté à produire du *dolo* par co-fermentation lactique et alcoolique contrôlée par inoculation en culture mixte de souches de

*Lact. fermentum* et l'isolat de levure ; le moût fermentescible utilisé comme substrat a été obtenu par une technique basée sur la méthode traditionnelle d'extraction du moût;

- la troisième série a été réalisée dans une unité de production de *dolo* (milieu réel), et a consisté à utiliser les souches de *Lact. fermentum* pour une fermentation lactique contrôlée du moût, et l'isolat de levure pour une fermentation alcoolique contrôlée du moût acidifié.

Du *dolo* traditionnel a été produit pour servir de témoin. Les échantillons de *dolo* obtenus ont été soumis à l'appréciation de jury de dégustateurs.

### **V.1.1 Préparation des inocula de *Lactobacillus fermentum* pour la conduite de la fermentation lactique du moût**

Les souches utilisées ont été sélectionnées parmi les souches dominantes de *Lact. fermentum* responsables de la fermentation lactique naturelle du moût du *dolo* (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007) et dont les propriétés technologiques ont été précédemment étudiées (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2008). Quatre (4) souches provenant des sites de production de *dolo* de Samandin et Zone 1 (Ouagadougou) ont été sélectionnées sur la base de leurs propriétés technologiques (Tableau XVIII, Tableau XXIV).

**Préparation des inocula:** les souches de *Lact. fermentum* conservées à -80°C dans du glycérol, ont été revivifiées sur la gélose MRS (Oxoid) après 48h d'incubation en anaérobiose à 37 °C. Pour chaque souche ZN4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8, un tube à essai contenant 10 ml de bouillon MRS stérile est inoculé avec une boucle de culture prélevée sur une colonie isolée sur la gélose MRS et mis à incuber à 37°C pour 24h (bouillon de culture). Une préculture de 16-18h (37°C) est ensuite préparée en inoculant 100 ml de bouillon MRS à 1% (v/v) avec le bouillon de culture précédente. La préculture est centrifugée (7000 g, 5 mn, 4°C) à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérante (Sigma 1K15 Struers, Kebolab). Le surnageant est éliminé et le culot est lavé une fois avec 100 ml d'eau distillée stérile, puis repris dans 100 ml d'eau distillée stérile. La suspension bactérienne ainsi obtenue a constitué l'inoculum utilisé pour la conduite de la fermentation lactique. La concentration en cellules viables (ufc/ml) des inocula a été déterminée sur la gélose MRS. Pour les essais en milieu réel, la préculture de 16-18h (37°C) a été préparée avec une suspension aqueuse de farine de malt de sorgho à 15% (m/v) préalablement stérilisée à 121°C pendant 15 mn puis refroidie; cette préculture a été utilisée directement comme inoculum.

**Tableau XVIII:** Caractéristiques technologiques des souches de *Lact. fermentum* sélectionnées pour la conduite de la fermentation lactique du moût du *dolo*

Codes des souches / Provenance	Caractéristiques technologiques (Tableau XXIV, annexe)
ZN4.1 / Zone 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>-<b>Pouvoir acidifiant</b>: appartient au groupe G2 avec un taux d'acidification de <math>1,12 \pm 0,15 \Delta\text{pH}</math> en 9h de fermentation d'extrait aqueux de malt de sorgho</li> <li>- <b>Activité antimicrobienne</b>: ++ (<i>Staph. aureus</i>); + (<i>E. coli</i>, <i>L. innocua</i>)</li> <li>- <b>Incapacité à produire des polyssaccharides exocellulaires</b> (EPSs)</li> <li>-<b>Amylase négative</b></li> </ul>
SF6.1a / Samandin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Pouvoir acidifiant</b>: appartient au groupe G2</li> <li>- <b>Activité antimicrobienne</b>: + (<i>Staph. aureus</i>); + (<i>E. coli</i>; <i>L. innocua</i>)</li> <li>- <b>Capacité à produire des EPSs</b></li> <li>-<b>Amylase négative</b></li> </ul>
SF8.2 /Samandin	<ul style="list-style-type: none"> <li>-<b>Pouvoir acidifiant</b>: appartient au groupe G2</li> <li>- <b>Activité antimicrobienne</b>: ++ (<i>Staph. aureus</i>); + (<i>E. coli</i>)</li> <li>- <b>Incapacité à produire des EPSs</b></li> <li>-<b>Amylase négative</b></li> </ul>
SD1.8 /Samandin	<ul style="list-style-type: none"> <li>-<b>Pouvoir acidifiant</b> : appartient au groupe G1 avec un taux d'acidification de <math>1,14 \pm 0,15 \Delta\text{pH}</math> en 6h de fermentation d'extrait aqueux de malt de sorgho</li> <li>- <b>Activité antimicrobienne</b>: ++ (<i>Staph. aureus</i>)</li> <li>- <b>Capacité à produire des EPSs</b></li> <li>- <b>Faible activité amylasique</b></li> </ul>

+: réaction positive avec une zone d'inhibition de 1 à 5 mm de large. ++: réaction positive avec une zone d'inhibition de 6 à 10 mm de large.

### V.1.2 Préparation de l'inoculum de levure L4 pour la conduite de la fermentation alcoolique du moût

**Isolement de la levure** : vingt (20) isolats de levure ont été obtenus à partir de deux échantillons de *dolo* en fin de fermentation alcoolique prélevés au site de Samandin (Ouagadougou). La gélose Sabouraud Chloramphénicol a été utilisée pour le dénombrement; l'isolement/purification des colonies a été fait en utilisant la gélose Malt agar (Merk) et le bouillon à l'extrait de malt (Merk). Les isolats purifiés ont été caractérisés par la morphologie des colonies et celle des cellules en contraste de phase par observation microscopique et le profil d'assimilation des hydrates de carbone en utilisant les galeries API ID 32 C. La majorité des isolats (17/20) a présenté des caractéristiques morphologiques et des profils d'assimilation des hydrates de carbone similaires à ceux de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* rapportés dans la littérature (Guiraud, 1998; Glover *et al.*, 2005), en particulier l'isolat L4 dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau XIX. Cet isolat a été retenu pour la conduite de la fermentation alcoolique contrôlée à cause de son arôme caractéristique et sa capacité d'assimilation des hydrates de carbone (glucose, galactose, saccharose, maltose, tréhalose et  $\alpha$ -méthyl-D-



glucoside). Son identification par le séquençage de l'ADN n'ayant pas été faite, l'isolat L4 appartiendrait au genre *Saccharomyces* spp. par présomption.

**Tableau XIX:** Caractéristiques de la levure L4 utilisée pour la fermentation alcoolique du moût

Paramètres	Caractéristiques
Morphologie des colonies	-Colonies lenticulaires ou étoilées dans la gélose Sabouraud chloramphénicol ensemencée dans la masse -Colonies rondes, blanchâtres, humides, crème sur la gélose à l'extrait de malt ensemencée en surface
Morphologie des cellules	Grosses cellules sphériques à ovales, isolées, en paires, à bourgeonnement multipolaire, formant des cellules agglutinées.
Assimilation des sucres (API ID 32 C)*:	
Glucose	+
Galactose	+
Saccharose	+
Maltose	+
Tréhalose	+
$\alpha$ -méthyl-D-glucoside	+
Autre	Odeur caractéristique prononcée
Identité probable	<i>Saccharomyces</i> spp.

+: réaction positive ; \*: les réactions sont négatives pour les autres hydrates de carbone.

**Préparation de l'inoculum de levure:** l'isolat L4 a été revivifié sur la gélose à l'extrait de malt (30°C, 48h). Un bouillon de culture de 24h (30°C) a été préparé en inoculant un tube à essai contenant 10 ml d'extrait de malt avec une boucle de culture prélevée sur une colonie isolée. Une préculture de 16-18h (30°C) est ensuite préparée avec de l'extrait de malt (150 ml) ensemencée à 1% (v/v) avec le bouillon de culture précédent. La préculture est centrifugée (5000 g, 5 mn, 4°C), le surnageant est éliminé et les cellules sont lavées avec de l'eau distillée stérile, puis reprises dans 150 ml d'eau distillée stérile. La suspension obtenue a été utilisée comme inoculum pour la conduite de la fermentation alcoolique. Pour les essais en unité de production (milieu réel), la préculture a été préparée avec du moût, puis utilisée directement comme inoculum. La concentration en cellules viables (ufc/ml) des inocula a été déterminée sur la gélose Sabouraud Chloramphénicol.

### V.1.3 Les essais de production du *dolo* au laboratoire

Deux types d'essais basés sur la méthode traditionnelle d'extraction du moût, mais sans utiliser l'extrait de *volga*, ont été réalisés au laboratoire du Département Technologie Alimentaire (DTA) de l'IRSAT/CNRST :

- une production d'échantillons de *dolo* par double fermentation lactique puis alcoolique (procédé traditionnel) au cours de laquelle la fermentation lactique est conduite après un ensemencement du moût avec *Lact. fermentum* ZN4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8, utilisés en monoculture, et la fermentation alcoolique des moûts acidifiés par inoculation avec la levure L4,
- une production d'échantillons de *dolo* par co-fermentation lactique et alcoolique de moût clarifié et concentré; le substrat est ensemencé simultanément avec *Lact. fermentum* ZN4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8 utilisés en monoculture et la levure L4 (culture mixte) puis incubé pour la fermentation.

#### V.1.3.1 Utilisation des souches sélectionnées en double fermentation lactique puis alcoolique du moût

##### a) Préparation du substrat et conduite de la fermentation lactique

Le substrat a été préparé selon la méthode traditionnelle de préparation du moût du *dolo* avec de la farine de malt de sorgho prélevée au site de Samandin. Une suspension aqueuse (800 ml) de farine de malt de sorgho à 15% (m/v) est préparée dans une fiole de 2 litre avec de l'eau distillée. La suspension est agitée pendant 10 mn (agitateur magnétique) puis laissée à décanter pendant 1h. Le surnageant est recueilli et le culot est dilué dans 200 ml d'eau distillée, puis chauffé sous agitation magnétique (plaque chauffante) jusqu'à ébullition. Le culot bouillant est mélangé au surnageant ; le mélange est agité pendant 20 mn, stérilisé (121°C, 20 mn), puis refroidi à la température du laboratoire; le volume est ajusté à 1000 ml avec de l'eau distillée stérilisée, et la suspension est utilisée comme substrat pour la fermentation lactique. Pour chaque souche de *Lact. fermentum*, le substrat est ainsi préparé en quadruple dans 4 fioles de 2 litres; un substrat est préparé pour servir de témoin non ensemencé. L'ensemencement a été fait en monoculture à un taux de 1% (v/v) d'inoculum de *Lact. fermentum* ZN4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8. Les suspensions ensemencées ont été homogénéisées puis incubées à 37°C pendant 24h. Des prélèvements (10 ml) en conditions aseptiques sont faits après homogénéisation, toutes les 3h pour la mesure du pH et le dénombrement des cellules viables de lactobacilles. Pour chaque souche, lorsque le pH du substrat a atteint des valeurs de l'ordre de 3,5-3,8 (pH requis pour le

moût du *dolo*), la fermentation lactique est arrêtée dans deux des quatre fioles puis le temps de fermentation est noté; le contenu de ces deux fioles a été préparé pour servir de substrat à la fermentation alcoolique. La fermentation lactique et les prélèvements ont été poursuivis dans les autres fioles dans l'objectif de disposer de données sur l'évolution du pH et de la biomasse jusqu'à 24h d'incubation.

#### ***b) Préparation du moût acidifié par fermentation lactique et conduite de la fermentation alcoolique***

Pour chaque souche lactique, le contenu des deux précédentes fioles a été préparé comme suit, pour la fermentation alcoolique : le surnageant acidifié est collecté puis mis à chauffer sur une plaque chauffante pour concentrer par ébullition. Le culot est dilué avec 100 ml d'eau bouillante puis filtré; le filtrat est rajouté au surnageant acidifié en chauffage. Le moût acidifié a été concentré à  $12\pm 1^\circ\text{Brix}$  (la concentration en matière sèche soluble de moûts prélevés dans les sites de production est de 11-14  $^\circ\text{Brix}$ ). Le moût concentré est refroidi et décanté, puis le surnageant est recueilli et utilisé comme moût final pour la fermentation alcoolique. Le moût acidifié issu de chaque souche de *Lact. fermentum* est réparti dans 2 erlens de 500 ml (300 ml/erlen) soit au total 8 erlens pour les 4 souches. Le moût estensemencé à 0,5% (v/v) d'inoculum de levure L4, puis incubé à 30°C pour la fermentation alcoolique. Au bout de 12h d'incubation, la fermentation alcoolique est arrêtée pour un premier groupe de 4 erlens, puis poursuivie dans les quatre autres erlens jusqu'à 24h d'incubation. Des prélèvements ont été faits toutes les 3h après homogénéisation du mélange, pour la mesure du pH et le dénombrement des cellules viables de levure L4. Pour se rapprocher du *dolo* traditionnel dont la durée de la fermentation alcoolique varie de 9-12h selon les sites de production (Sawadogo-Lingani et al., 2007), seuls les échantillons de *dolo* de 12h de fermentation alcoolique ont été soumis à l'appréciation du jury de dégustateurs.

### **V.1.3.2 Utilisation des souches sélectionnées en co-fermentation lactique et alcoolique du moût**

#### ***a) Préparation du substrat pour la conduite de la co-fermentation***

Le substrat utilisé pour la co-fermentation est un moût non acidifié de concentration en matières sèches solubles similaire au moût du *dolo* traditionnel ( $12\pm 1^\circ\text{Brix}$ ). Il a été préparé avec de la farine de malt de sorgho, selon la méthode traditionnelle de préparation du moût, sans utiliser de l'extrait de yolga. Quelques paramètres physico-chimiques (pH, Brix, température)

ont été mesurés tout au long de la préparation du substrat. Une suspension aqueuse (2 litres) de farine de malt de sorgho à 15% (m/v) a été préparée dans un erlen avec de l'eau distillée. La suspension est agitée (10 mn), décantée (1h) et le surnageant (surnageant A) est recueilli (mesure du pH, degré Brix, température). Le culot est dilué dans 400 ml d'eau distillée puis chauffé sous agitation (plaque chauffante magnétique) jusqu'à ébullition (mesure de la température, pH, degré Brix au début et en fin de chauffage). Le culot bouillant est mélangé au surnageant A; la suspension obtenue est homogénéisée et décantée pendant 3 h à la température ambiante (mesure de température, degré Brix et pH à chaque heure), puis le surnageant (surnageant B) est recueilli (mesure du degré Brix, du pH, de la température); la suspension intermédiaire est recueillie séparément, diluée dans 100 ml d'eau distillée puis chauffée jusqu'à ébullition. Après décantation, le surnageant est recueilli et mélangé au surnageant B (mesure de degré Brix et pH), puis le mélange est concentré par ébullition pendant 2h sur une plaque chauffante. La concentration est suivie par la mesure du degré Brix. La cuisson/concentration est arrêtée lorsque la concentration en matière sèche soluble est de  $12 \pm 1^\circ$ Brix. Le moût concentré est refroidi et décanté à la température du laboratoire; le surnageant est recueilli et utilisé comme substrat (moût concentré non acidifié) pour la co-fermentation.

#### ***b) Ensemencement et conduite de la co-fermentation lactique et alcoolique***

Les inocula de *Lact. fermentum* (ZN4.1, SF6.1a, SF8.2, SD1.8) et l'inoculum de levure L4 ont été utilisés. Le moût concentré non acidifié a été réparti dans des erlens de 500 ml (300 ml/erlen), stérilisé (121°C, 20 mn) puis refroidi à la température du laboratoire. Le contenu de chaque erlen est simultanémentensemencé avec une souche *Lact. fermentum* à un taux de 1% d'inoculum (v/v) et la levure L4 à un taux de 0,5% d'inoculum (v/v); l'ensemencement est fait en quadruple. Le moûtensemencé est homogénéisé puis incubé (37°C, 24h). Un substrat nonensemencé est utilisé comme témoin. Des prélèvements (10 ml) sont faits dans des conditions aseptiques toutes les 3h pour le dénombrement des cellules viables de *Lact. fermentum*, de levure L4 et pour la mesure du pH.

Des échantillons de *dolo* obtenu après 12h et 24h de co-fermentation ont été soumis à l'appréciation du jury de dégustateurs.

#### **V.1.4 Les essais réalisés en unité de production du *dolo***

Ces essais ont été réalisés au Secteur 3 de la ville de Ouagadougou, avec la collaboration de Mesdames Marie Solange Somda et Rosalia Méda.

#### ***V.1.4.1 Préparation du substrat pour la fermentation lactique***

La méthode traditionnelle a été suivie. Pour minimiser les risques de contamination, le matériel utilisé est soigneusement lavé à l'eau savonneuse, rincé à l'eau potable puis décontaminé par un trempage à l'eau bouillante pendant 15 mn; de plus, les produits sont couverts pendant la production. Une suspension de farine de malt de sorgho blanc/eau/extrait de *yolga* dans les proportions 1/4/1 (v/v/v) a été préparée, puis soumise aux opérations du brassage traditionnel du *dolo* jusqu'à l'opération qui consiste à mélanger le surnageant et le culot bouillant (Fig. 18) et ce, selon le savoir faire de la dolotière. Le mélange (surnageant + culot bouillant) est laissé au repos pendant 2h et le surnageant est recueilli. Quatre mélanges constitués chacun de 7 litres de surnageant et 7 litres de culot, soit un volume total de 14 litres, sont constitués dans des casseroles en aluminium munies de couvercles pour la conduite de la fermentation lactique. Le reste du surnageant est mélangé au reste du culot pour une fermentation naturelle non contrôlée destinée à une production parallèle de *dolo* traditionnel. Les mélanges constitués sont refroidis à 35-37°C puisensemencés.

#### ***V.1.4.2 Ensemencement et conduite de la fermentation lactique***

En rappel, les inocula lactiques utilisés ici sont préparés avec une suspension aqueuse stérilisée de farine de malt de sorgho. Le contenu de chaque casserole (14 litres) estensemencé à 1% (v/v) d'inoculum de *Lact. fermentum*. Le mélange est laissé à fermenter à la température ambiante de la salle. Des prélèvements sont faits toutes les 3h pour la mesure du pH, le dénombrement des cellules viables de lactobacilles et de coliformes totaux ; la fermentation est arrêtée lorsque le pH requis de 3,5-3,8 est atteint et le temps de fermentation effectif est noté.

#### ***V.1.4.3 Préparation du moût acidifié et conduite de la fermentation alcoolique***

Lorsque le pH de la suspension fermentée par chaque souche lactique atteint la valeur requise, le surnageant est recueilli et mis à chauffer pour arrêter le processus de fermentation. Le culot acidifié est filtré avec ajout d'eau et d'extrait de *yolga*, puis le filtrat est rajouté au surnageant en cuisson. La concentration par ébullition est réalisée par chauffage au gaz pendant environ 2h. Le moût concentré est refroidi et décanté à la température ambiante pendant 3h; le surnageant est utilisé comme moût pour la fermentation alcoolique. Le moût estensemencé à 0,5% d'inoculum de levure L4, puis laissé à fermenter pendant 12h à la température ambiante de la salle. Des prélèvements ont été effectués au début et en fin de fermentation pour la mesure du pH et le dénombrement de levures et de coliformes totaux.

Cinq (5) échantillons de *dolo* ont été produits : quatre (4) avec les souches de *Lact fermentum* et l'isolat L4 de levure, portant les références ZN4.1/L4, SF6.1a/L4, SF8.2/L4 et SD1.8/L4 et un échantillon de *dolo* traditionnel référencé DT. Ces échantillons ont été conditionnés en bidons puis transportés au DTA pour l'évaluation sensorielle par un échantillon de consommateurs.

### **V.1.5 Analyse des paramètres microbiologiques et physico-chimiques**

La composition en macronutriments des échantillons de farine de malt de sorgho utilisé pour les essais au laboratoire et en unité de production a été déterminée. Les protéines totales ont été déterminées par la méthode Kjeldahl (NF V03-050, 1970), la matière grasse par extraction au soxhlet, les cendres ou sels minéraux totaux par incinération à 550°C (NF V03-760, 1981), l'humidité par dessiccation à 105°C (NF V03-707, 2000); les taux sucres totaux ont été calculés par différence et les sucres réducteurs par la méthode au dinitrosalisilate (Miller, 1959). Ces caractéristiques ont été de  $9,9\pm 0,9$  % pour l'humidité,  $77,9\pm 2,4$  % pour les sucres totaux,  $5,2\pm 0,5$  % pour les sucres réducteurs,  $8,2\pm 0,8$  % pour les protéines totales,  $1,8\pm 0,4$  % pour la matière grasse et  $2,2\pm 0,3$  % pour les sels minéraux totaux.

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Consort P201 Scientific Instrument, Turnhout, Belgium); le degré Brix a été déterminé au refractomètre (Krüss Optronic GmbH, Hamburg, Germany).

Le dénombrement des cellules viables des microorganismes a été réalisé en triple par la technique de comptage des colonies sur milieu gélosé et les résultats ont été exprimés en ufc/ml (ou /g). La suspension mère a été préparée avec 1ml d'échantillon et 9 ml de diluent stérile (0,85% de peptone, 0,1% de NaCl, pH  $7,0\pm 0,2$ ). Les cellules viables de levure L4 ont été dénombrées sur le milieu Sabouraud Chloramphénicol après 72h d'incubation à 30°C. Les cellules viables de *Lact. fermentum* ont été dénombrées sur le milieu MRS gélosé après 72h d'incubation à 37°C en anaérobiose dans des jarres d'anaérobiose avec l'Anaréocult A. Les coliformes totaux ont été dénombrés après 24h d'incubation à 30°C sur la gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL).

### **V.1.6 Evaluation sensorielle des échantillons de *dolo***

#### **V.1.6.1 Evaluation des échantillons de *dolo* produits au laboratoire**

L'évaluation sensorielle a porté sur les quatre échantillons de *dolo* obtenus par double fermentation lactique (arrêtée à pH 3,5-3,8, soit 6-9 h de fermentation lactique selon les souches) puis alcoolique de 12 h, et les échantillons obtenus par la co-fermentation prélevés à 12 h et 24 h.

L'évaluation a été faite par un jury de dégustateurs non entraînés composé de 5 consommateurs de *dolo*. Chaque dégustateur a reçu un échantillon codifié (30 ml) de chacun des 4 types de *dolo* et un verre d'eau de rinçage de bouche. A l'aide d'un questionnaire guide, les caractéristiques organoleptiques notamment l'aspect général, le goût et l'arôme ont été appréciés, puis les quatre échantillons de *dolo* de chaque série ont été classés par ordre de préférence. Un des objectifs visé a été de savoir si les produits issus de la co-fermentation ont des caractéristiques comparables à celles du *dolo* traditionnel. Les fiches ont été dépouillées manuellement.

### V.1.6.2 Evaluation des échantillons de *dolo* produits en unité de production

Les cinq échantillons de *dolo* ont été soumis à l'appréciation d'un échantillon de consommateurs non entraînés constitué de 21 personnes, conformément à un questionnaire guide axé sur l'aspect général, l'arôme, le goût et le classement selon la préférence. Chaque dégustateur reçoit un questionnaire, une explication par rapport à l'objectif de la séance de dégustation, des échantillons codifiés des 5 types de *dolo* et un verre d'eau de rinçage de bouche. Les dégustateurs non alphabétisés sont assistés pour le remplissage des fiches. Les fiches ont été dépouillées manuellement.

## V. 2 Résultats

### V.2.1 Caractéristiques des inocula des souches utilisées

Les inocula de *Lact. fermentum* ZN 4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8 utilisés pour la fermentation lactique au laboratoire, contenaient entre 8,97 log ufc/ml et 9,20 log ufc/ml; les inocula préparés avec la suspension aqueuse stérilisée de farine de malt de sorgho ont donné de plus fortes concentrations en cellules viables avec des valeurs comprises entre 9,83 log ufc /ml et 9,96 log ufc/ml (Tableau XX). Une concentration moyenne de 7,75 log ufc/ml a été obtenue pour les inocula de levure L4 utilisés pour la fermentation alcoolique des moûts acidifiés (Tableau XX).

**Tableau XX:** Concentrations moyennes en cellules viables (log ufc/ml) des inocula de *Lact. fermentum* et de levure L4 utilisés pour les essais de fermentation

Essai	Inocula de <i>Lactobacillus fermentum</i> (log ufc/ml)				Inocula de levure L4 (log ufc/ml)
	ZN4.1	SF6.1a	SF8.2	SD1.8	
Laboratoire	8,97	9,15	9,20	9,08	7,75
Unité de production	9,83	9,87	9,93	9,96	nd

nd : non déterminé

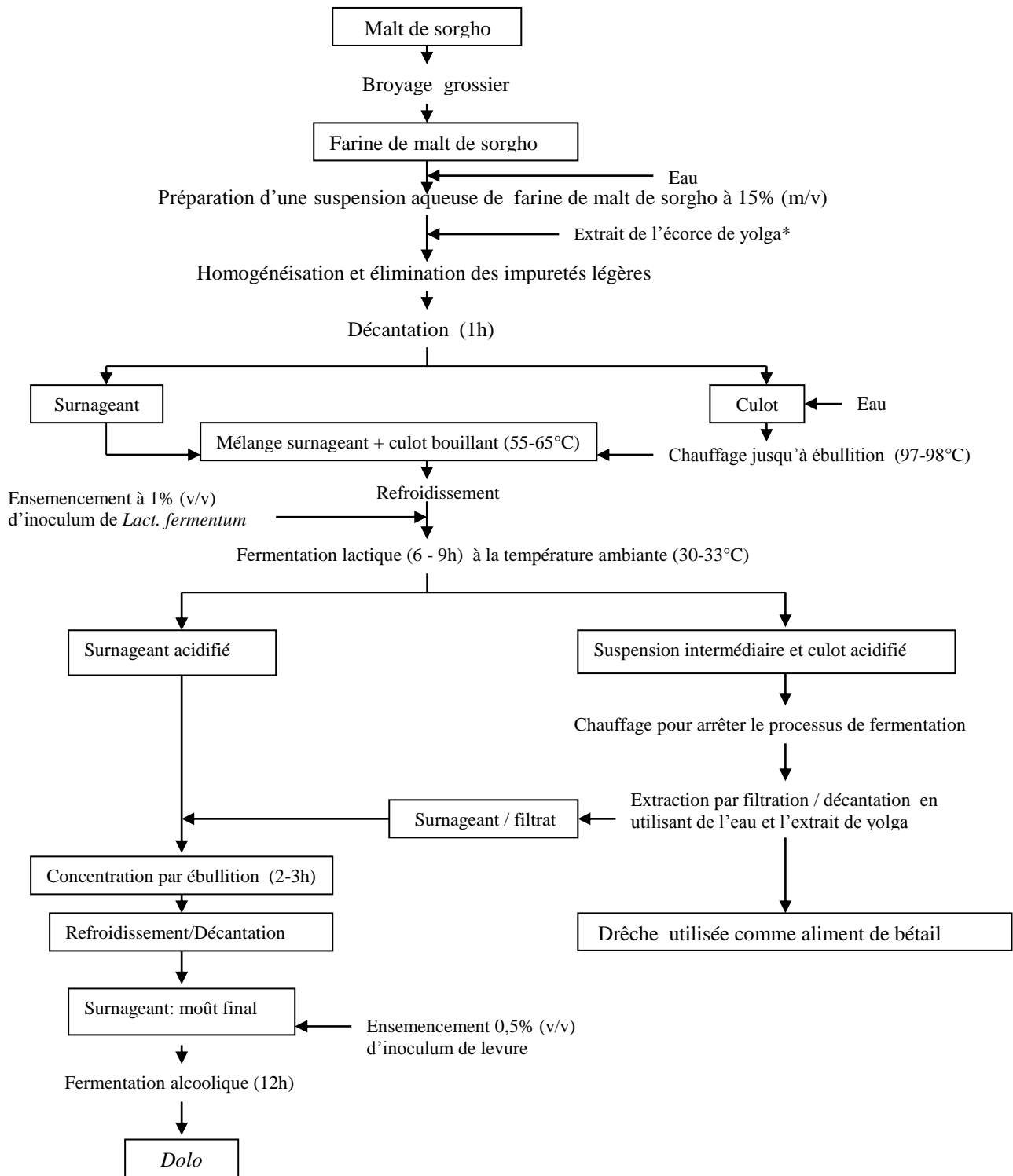
## V.2.2 Diagrammes de production du *dolo* avec les souches sélectionnées

Sur la base du procédé traditionnel de fabrication du *dolo* dont le diagramme a été précédemment établi, les essais au laboratoire et en unité de production (milieu réel) ont permis d'établir deux diagrammes de production avec l'utilisation de cultures starter de *Lact. fermentum* et de levure, qui pourraient être proposés aux unités de production : un diagramme de production du *dolo* par double fermentation lactique puis alcoolique contrôlée par inoculation (Fig.18) et un diagramme de production du *dolo* par co-fermentation lactique et alcoolique contrôlée par inoculation (Fig.19). Pour la fermentation lactique, l'inoculum de *Lact. fermentum* sera préparé avec une suspension de farine de malt de sorgho, dans les unités de production. Pour la fermentation alcoolique, l'inoculum de levure sera préparé avec du moût, ou bien procéder comme dans la méthode traditionnelle, à l'ensemencement avec la levure sèche.

## V.2.3 Evolution des paramètres physico-chimiques durant la préparation du substrat pour la conduite de la co-fermentation

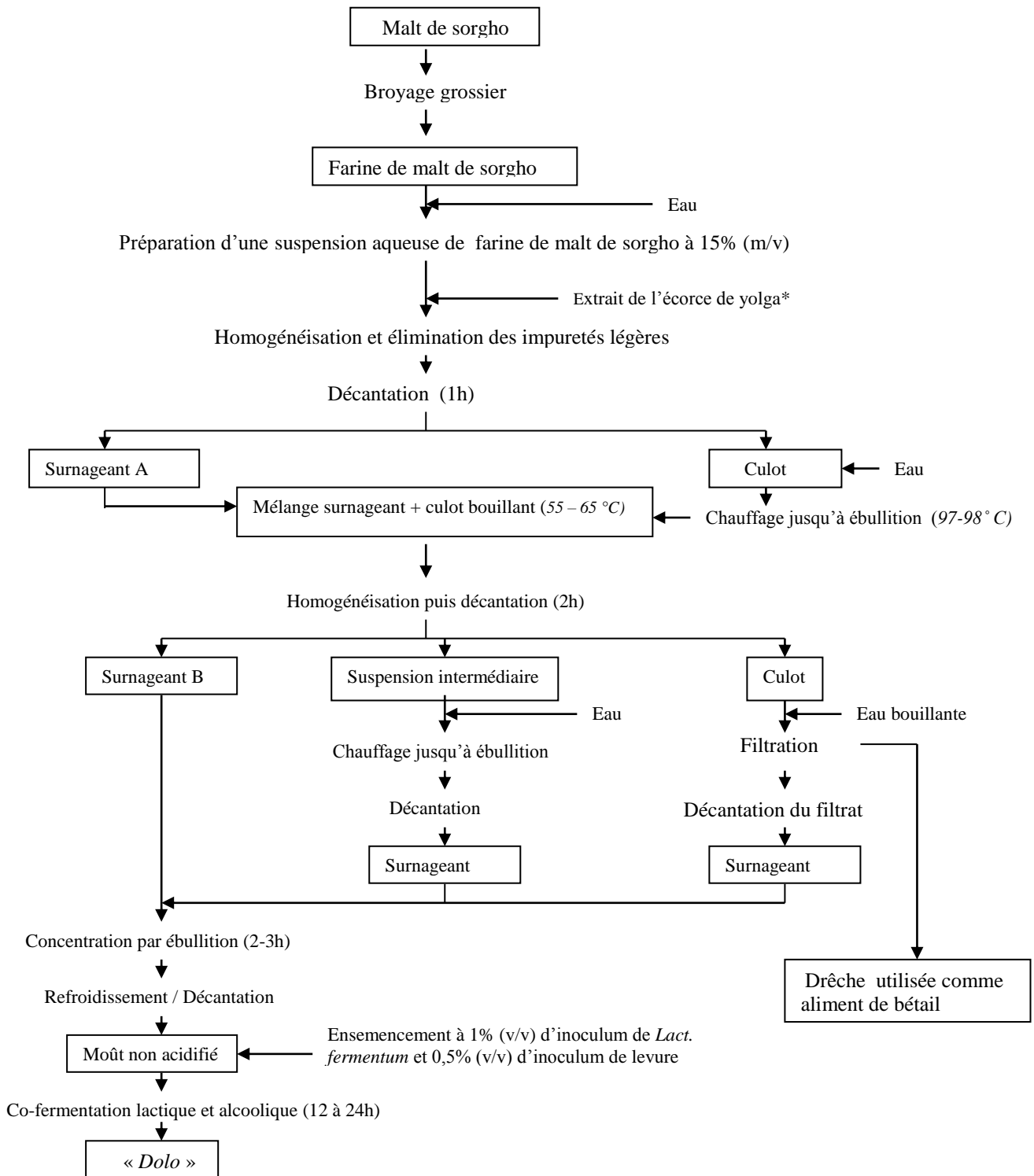
La quantité de moût utilisée pour les différents essais de fermentation a nécessité plusieurs séries de préparation du substrat. Les paramètres mesurés tout au long des différentes opérations de cette préparation ont donné les résultats présentés dans le Tableau XXI. On constate que le pH a très peu varié depuis le surnageant A des suspensions aqueuses de farine de malt de sorgho (pH 4,84) jusqu'à l'extrait concentré (moût final non acidifié) utilisé pour les essais (pH 4,90). La concentration en matière sèche soluble mesurée au réfractomètre, a par contre augmenté: d'environ 3° Brix pour le surnageant A et le culot, elle augmente pendant le chauffage et atteint 11,2° Brix pour le culot bouillant à une température moyenne de 97,6°C (Tableau XXI). Ce chauffage a permis d'enregistrer pour les mélanges (surnageant A + culot bouillant) une température moyenne de 60,4°C et une concentration moyenne en matières sèches de 8,8°Brix. Une durée de 3 h de décantation semble avoir peu d'effet sur le degré Brix et le pH du surnageant et de la suspension intermédiaire (Tableau XXI). Le moût non concentré a un Brix moyen de 8,4 et un pH de 4,93. Après la concentration par ébullition puis le refroidissement, seul le brix augmente et atteint environ 12,2°, contrairement au pH qui varie peu, environ 4,90 (Tableau XXI). C'est ce moût final qui a été utilisé comme substrat pour les essais de co-fermentation.





\*: l'extrait aqueux de l'écorce de *yolga* (*Grewia bicolor*, Juss) est utilisé comme mucilage pour favoriser la décantation et clarifier le moût final

**Fig. 18** : Diagramme de production du *dolo* par double fermentation lactique puis alcoolique du moût avec inoculation de *Lactobacillus fermentum* et de levure



\*: l'extrait aqueux de l'écorce de *yolga* (*Grewia bicolor*, Juss) est utilisé comme mucilage pour favoriser la décantation et clarifier le moût final

**Fig. 19** : Diagramme de production du *dolo* par co-fermentation lactique et alcoolique du moût avec inoculation de *Lact. fermentum* et de levure

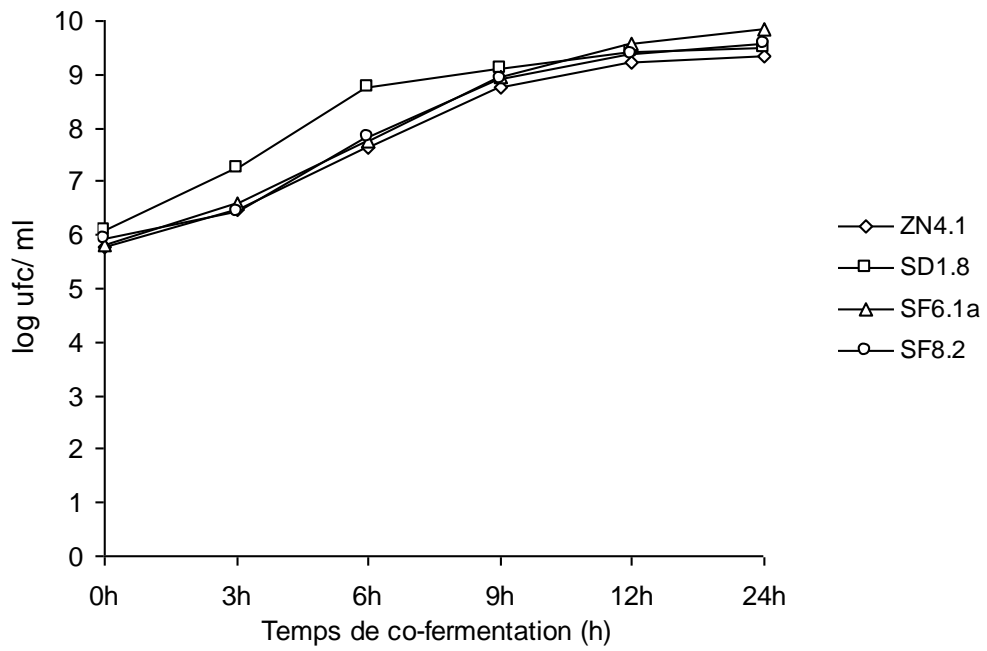
**Tableau XXI:** Paramètres mesurés pendant la préparation du substrat utilisé pour les essais de co-fermentation lactique et alcoolique

Echantillons	pH	°Brix	Température (°C)
Surnageant A (SA)	4,84±0,15	3,0±0,6	31,2±1,6
Culot dilué avant chauffage	4,84±0,15	3,0±0,6	30,2±1,5
Culot dilué bouillant (Cb)	4,87±0,30	11,2±4,7	97,6±0,6
Mélange (Surnageant A + Culot bouillant)	4,84±0,23	8,8±1,5	60,4±5,1
Mélange (Surnageant A + Culot bouillant) après 3h de décantation	4,85±0,21	9,0±1,2	40,3±3,1
Surnageant B	4,88±0,26	8,6±1,4	31,2±1,4
Suspension intermédiaire	4,90±0,24	8,8±1,6	32,2±1,2
Moût non concentré	4,93±0,20	8,4 ±1,4	30,5±1,0
Moût concentré refroidi (moût final non acidifié)	4,90±0,13	12,2±1,0	30,8±1,2

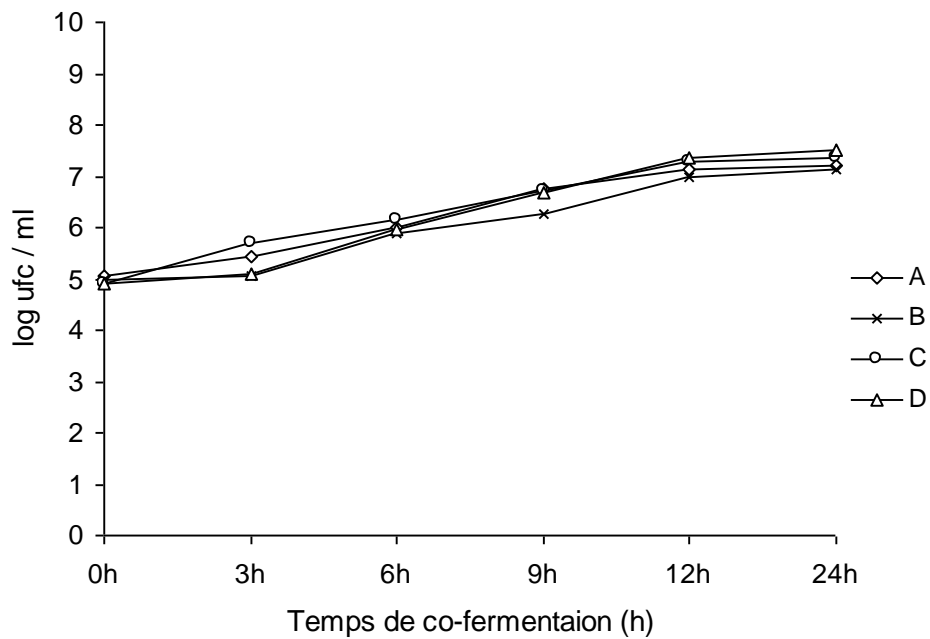
#### V.2.4 Evolution des paramètres physico-chimiques et microbiologiques pendant les essais de fermentation au laboratoire

##### a) pH et développement des microorganismes pendant la co-fermentation lactique et alcoolique du moût

Le développement des quatre souches de *Lact. fermentum* et celui de la levure L4 pendant la co-fermentation du moût sont illustrés par les Figures 20 et 21. Avec des taux d'ensemencement de 1% (v/v) d'inoculum lactique et 0,5% (v/v) d'inoculum de levure L4, la biomasse microbienne initiale (0h) pour *Lact. fermentum* ZN4.1, SD1.8, SF6.1a et SD8.2 a été de l'ordre de 5,76-6,08 log ufc/ml; une croissance cellulaire a été observée au cours du temps et des valeurs de 7,63 - 8,78 log ufc/ml, 8,76 - 9,11 log ufc/ml et 9,23 - 9,59 log ufc/ml et 9,34-9,82 log ufc/ml ont été atteintes respectivement en 6h, 9h, 12 h et 24 h de co-fermentation (Fig.20).

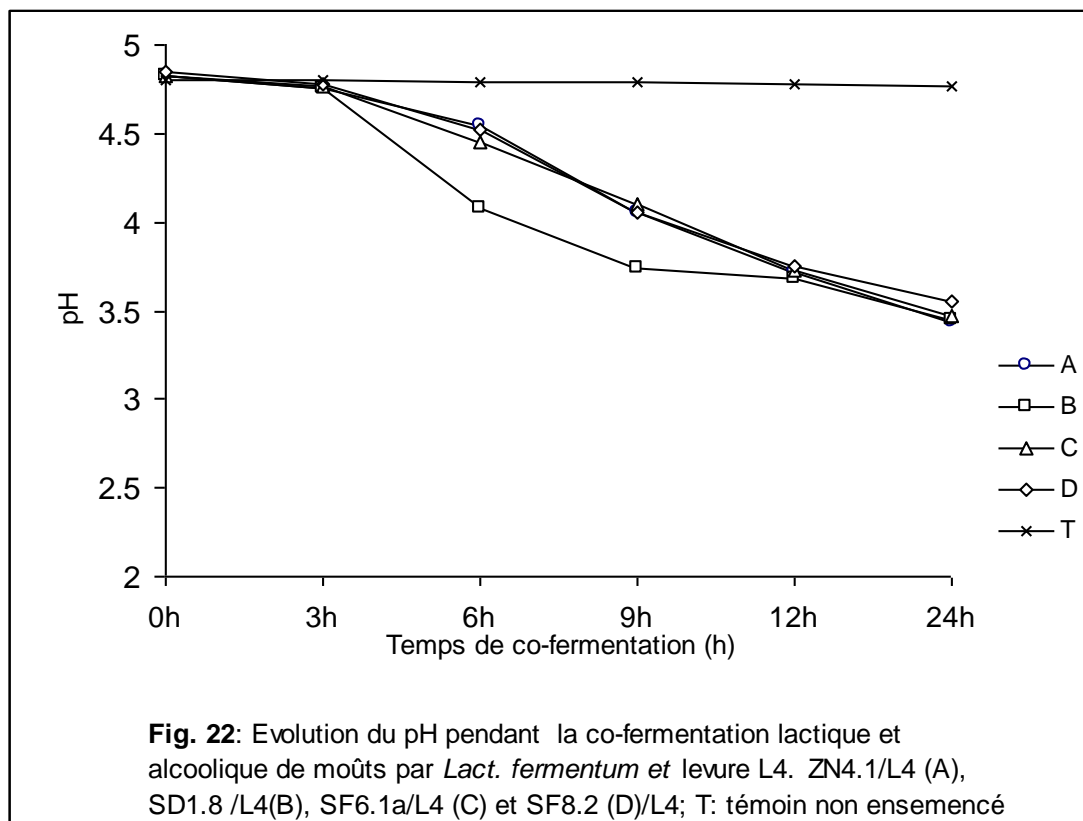


**Fig 20:** Evolution de la biomasse de *Lact. fermentum* ZN4.1, SD1.8, SF6.1a et SF8.2 pendant la co-fermentation lactique et alcoolique du moût



**Fig. 21:** Evolution de la biomasse de la levure L4 pendant la co-fermentation lactique et alcoolique de moûts par *Lact. fermentum* et levure L4. ZN4.1/L4 (A), SD1.8/L4(B), SF6.1a/L4(C) et SF8.2/L4 (D)

Pour la levure L4 qui a contrôlé la fermentation alcoolique, la biomasse initiale (0h) a été de 4,92 - 5,04 log ufc/ml, puis des concentrations cellulaires de 5,90-6,15 log ufc/ml, 6,25-6,75 log ufc/ml, 6,98-7,34 log ufc/ml et 7,11-7,50 log ufc/ml ont été enregistrées respectivement en 6h, 9h, 12h et 24h de co-fermentation (Fig.21). Simultanément à la croissance microbienne, une baisse du pH du moût est observée : d'environ 4,8 en début de co-fermentation, des pH de 4,08-4,54, 3,74-4,05, 3,68-3,75 et 3,43-3,55 ont été notés respectivement en 6h, 9h, 12h et 24h de co-fermentation (Fig.22). Le pH du témoin nonensemencé a très peu varié (4,77-4,80). La formation de mousse qui traduit la production de gaz notamment le CO<sub>2</sub> a été perceptible à partir de 6h de co-fermentation.

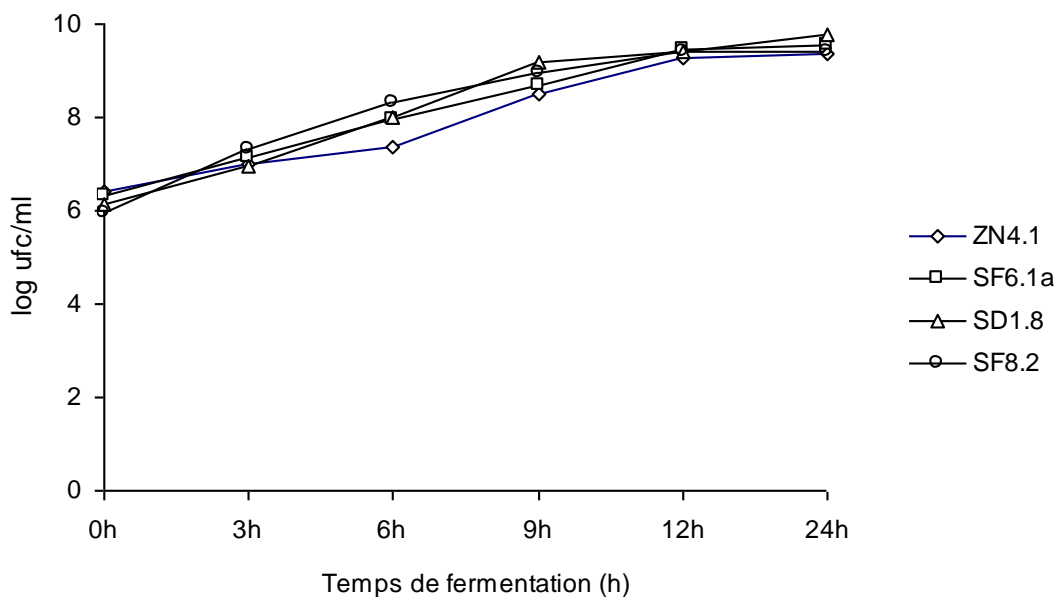


### ***b) pH et développement des microorganismes au cours de la double fermentation lactique puis alcoolique du moût***

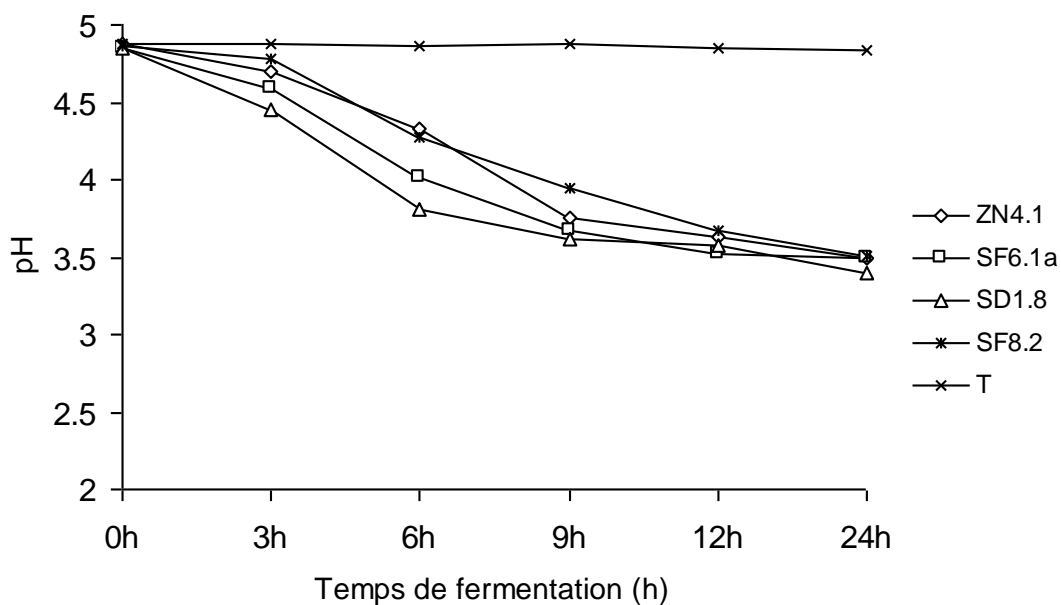
Les résultats sont illustrés par les Figures 23 à 26. La fermentation lactique de la suspension aqueuse de farine de malt de sorgho par *Lact. fermentum* ZN4.1, SD1.8, SF6.1a et SD8.2 utilisés en monoculture, a été caractérisée par un développement bactérien et une diminution concomitante du pH de la suspension. La biomasse lactique a augmenté de 5,94-6,41 log ufc/ml en début de fermentation à 7,34-8,30 log ufc/ml, 8,50-9,17 log ufc/ml et 9,28-9,46 log ufc/ml respectivement en 6h, 9h et 12h de fermentation lactique (Fig 23). Quant au pH de la suspension, il a baissé de 4,86 (0h) à 3,81-4,33, 3,62-3,94 et 3,52-3,67 respectivement en 6h, 9h et 12h de fermentation (Fig 24). En 24h de fermentation lactique, la biomasse a atteint 9,36-9,76 log ufc/ml et le pH l'ordre de 3,40-3,51. Le pH du témoin a très peu varié. La souche SD1.8 se distingue des autres par son pouvoir acidifiant (Fig. 24).

Les suspensions acidifiées ont été traitées par décantation/filtration et concentration par ébullition puis refroidis pour donner les moûts finaux utilisés comme substrat pour la fermentation alcoolique par la levure L4. Pendant cette phase de fermentation alcoolique, le développement de la levure L4 a été similaire dans les quatre moûts acidifiés par les quatre souches de *Lact. fermentum*, comme l'illustre la Fig. 25 qui montre des courbes de croissance confondues. La biomasse levurienne a augmenté de 5,17-5,28 log ufc/ml en début de fermentation à 6,18-6,30 log ufc/ml, 6,94-7,08 log ufc /ml et 7,62-7,79 log ufc /ml respectivement en 6h, 9h et 12h de fermentation (Fig.25). Une légère baisse du pH d'environ 0,1 unité pH a été observée en 12h de fermentation alcoolique (Fig.26).

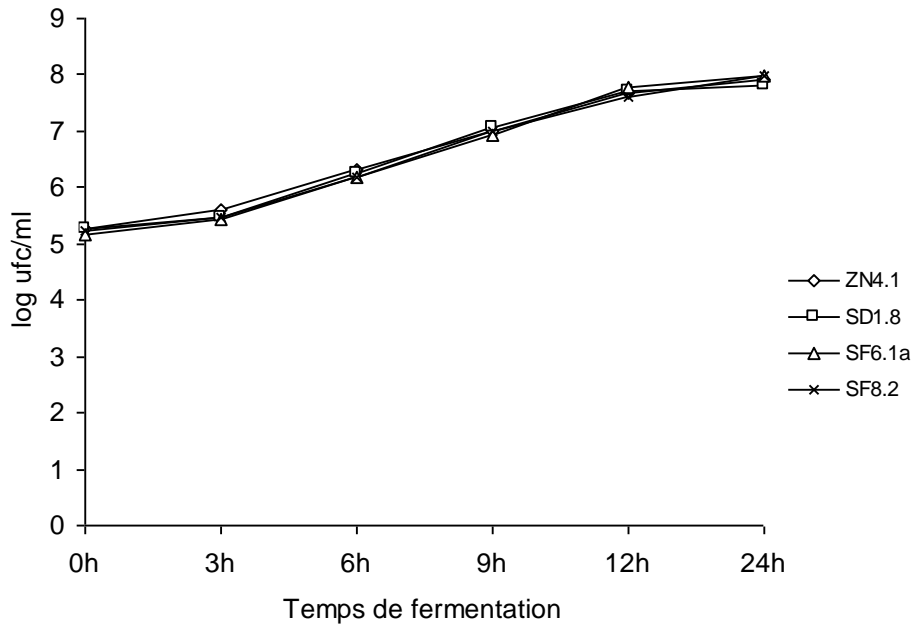
En examinant l'abaissement du pH qui résulte de la production d'acides organiques, on constate que celui-ci est retardé d'environ 2-3h pour la co-fermentation par rapport à la fermentation lactique conduite seule. Ainsi par exemple, si pour les quatre souches de *Lact. fermentum*, des pH de 3,68-3,75 ont été enregistrés en 12h de co-fermentation, des valeurs similaires de pH (3,62-3,94) ont été enregistrées en 9h de fermentation lactique. La co-fermentation semble ralentir l'abaissement du pH du milieu. Elle semble par contre favorable à la croissance de *Lact. fermentum* : en comparant les données des figures 20 et 23, on remarque que la biomasse lactique est en moyenne multipliée par (1,8-2,7) log, 3 log et 3,5 log respectivement en 6h, 9h et 12h de co-fermentation ; alors que pour les mêmes temps, celle-ci est multipliée par (1,4-1,9) log, (2,5-2,7)log et (3,0-3,3)log pendant la fermentation lactique conduite seule.



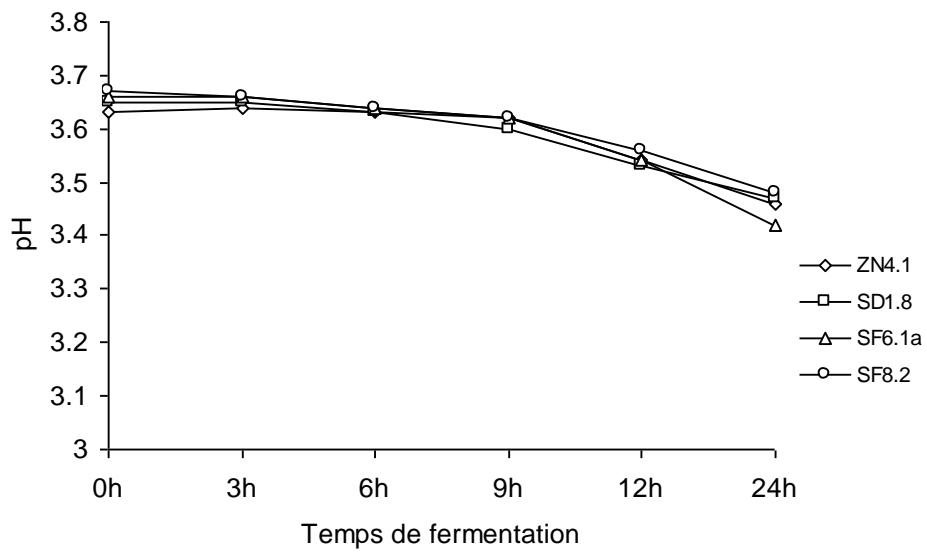
**Fig.23:** Evolution de la biomasse de *Lact. fermentum* ZN4.1, SF6.1a, SD1.8 et SF8.2 durant la fermentation lactique du moût



**Fig.24:** Evolution du pH durant la fermentation lactique de moûts par *Lact. fermentum* ZN4.1, SF6.1a, SD1.D et SF6.2; T: témoin non ensemencé



**Fig.25:** Evolution de la biomasse de la levure L4 pendant la fermentation alcoolique de moûts préalablement fermentés par *Lact. fermentum* ZN4.1, SD1.8, SF6.1a et SF8.2



**Fig. 26:** Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique (par la levure L4) de moûts préalablement fermentés par *Lact. fermentum* ZN4.1, SD1.8, SF6.1a et SF8.2



Le même effet n'est pas observé pour la croissance de la levure L4, pour laquelle l'évolution de la biomasse est presque similaire en co-fermentation (Fig 21) qu'en fermentation alcoolique conduite seule (Fig 25); les facteurs sont, dans le même ordre, en moyenne de 1,1 log et 1 log en 6h, (1, 3-1,7) log et (1,7-1,8) log en 9 h, (2,0-2,3) log et (2,4-2,5) log en 12 h.

### V.2.5 Paramètres physico-chimiques et microbiologiques pendant les essais réalisés en unité de production

Les essais en milieu réel ont donné des résultats (Tableau XXII a & b) comparables à ceux du laboratoire. Neuf (9) heures de fermentation lactique contrôlée par les souches sélectionnées de *Lact. fermentum* ont été suffisantes pour atteindre le pH requis de 3,5-3,8. A partir d'un pH initial de 4,8-4,9, les pH en fin de fermentation lactique enregistrés ont été compris entre 3,61 (suspension fermentée par la souche SD8.1) et 3,76 (suspension fermentée par la souche ZN4.1). Par contre, 13h de fermentation lactique naturelle non contrôlée ont été nécessaires pour obtenir un pH de 3,65 (Tableau XXIIa). La biomasse microbienne a augmenté de 6,23-6,86 log ufc/ml (0h) à 9,32-9,57log ufc/ml en 9h de fermentation lactique contrôlée par les souches *Lact. fermentum* (Tableau XXIIa) et de 5,25-5,41 log ufc/ml (0h) à 7,67-7,80 log ufc/ml en 12h de fermentation alcoolique contrôlée par la levure L4 (Tableau XXIIb). Des valeurs similaires ont été observées pour la fermentation lactique naturelle non contrôlée (Tableau XXIIa).

**Tableau XXIIa:** pH et biomasse de bactérie lactique pendant la fermentation lactique en unité de production du *dolo*

Temps	Fermentation lactique contrôlée par <i>Lact. fermentum</i>				Fermentation lactique naturelle non contrôlée (procédé traditionnel)
	ZN4.1	SD1.8	SF6.1a	SF8.2	
<i>pH</i>					
0h	4,87 ±0,03	4,88±0,02	4,85±0,03	4,85±0,01	4,92±0,02
9h	3,76±0,02	3,61±0,03	3,72±0,01	3,72±0,02	3,65 ±0,02 (13h)
<i>Biomasse (log ufc/ml)</i>					
0h	6,86	6,76	6,69	6,23	3,69
9h	9,32	9,57	9,50	9,32	9,56 (13h)

**Tableau XXIIb:** pH et biomasse de levure pendant la fermentation alcoolique de moûts (acidifiés par *Lact. fermentum* ZN4.1, SD1.8, SF6.1a, SF8.2) en unité de production du *dolo*

Référence des moûts → Temps ↓	Fermentation alcoolique contrôlée par la levure L4				Fermentation alcoolique par la levure locale (procédé traditionnel)
	ZN4.1/L4	SD1.8/L4	SF6.1a/L4	SF8.2/L4	
<b>pH</b>					
0h	3,74±0,02	3,65±0,01	3,70±0,01	3,71±0,01	3,74±0,02
12h	3,65±0,01	3,57±0,01	3,61±0,02	3,63±0,02	3,65±0,02
<b>Biomasse (log ufc/ml)</b>					
0h	5,25	5,38	5,28	5,41	nd
12h	7,75	7,67	7,76	7,80	7,93

nd : non déterminé

## V.2.6 Appréciation des échantillons de *dolo* par le jury de dégustation

### V.2.6.1 Les échantillons de *dolo* produits au laboratoire

- **Les échantillons de *dolo* produits par co-fermentation lactique et alcoolique:** Les échantillons de *dolo* ZN4.1/L4, SD1.8/L4, SF6.1a/L4 et SF8.2/L4 de 12 h (4) et de 24 h (4) de co-fermentation, ont été appréciés par 5 dégustateurs, tous agents du DTA connaissant bien le *dolo* et le consommant habituellement. Il a été demandé aux dégustateurs d'apprécier l'aspect général, le goût et la flaveur des échantillons codifiés puis de les classer par ordre de préférence. Le dépouillement a donné les tendances suivantes pour les échantillons de 12h de co-fermentation: les 5 dégustateurs ont trouvé que les quatre échantillons répondaient aux caractéristiques du *dolo* du point de vue du goût, de la flaveur et de l'aspect général. Trois (3) dégustateurs ont noté que ces échantillons de *dolo* étaient plus troubles et contenaient trop de levures en suspension. Pour le classement selon la préférence, la tendance a été la suivante: 2 dégustateurs ont classé 1<sup>er</sup> l'échantillon SF8.2/L4, 2<sup>ème</sup> les échantillons SD1.8/L4 et SF6.1a/L4, 3<sup>ème</sup> l'échantillon ZN4.1/L4 qu'ils ont qualifié de *dolo* léger. Un dégustateur a par contre classé 1<sup>er</sup> l'échantillon SD1.8/L4, 2<sup>ème</sup> l'échantillon ZN4.1/L4, 3<sup>ème</sup> l'échantillon SF6.1a/L4, et 4<sup>ème</sup> l'échantillon SF8.2/L4; celui-ci qualifie de *dolo* doux ses deux premiers choix et de « *tossé* » son dernier choix. Signalons que le qualificatif « *tossé* » en langue nationale *moré* signifie *dolo* fortement alcoolisé. Les deux autres dégustateurs ont trouvé que les quatre échantillons sont tous bons, similaires et donc difficiles de

les classer. Les échantillons de 24h de co-fermentation ont reçu une appréciation satisfaisante par les dégustateurs; 3 dégustateurs ont relevé une acidité plus prononcée pour ces échantillons ; et 3 autres les ont qualifié de « *tossé* ».

**-Les échantillons de *dolo* produits par double fermentation lactique puis alcoolique:** Rappelons que les échantillons dégustés sont ceux obtenus par fermentation lactique de 6-9 h selon les souches (pH 3,5-3,8) suivie d'une fermentation alcoolique de 12 h. Quatre échantillons de *dolo* ZN4.1/L4, SD1.8/L4, SF6.1a/L4 et SF8.2/L4 ont été appréciés par 5 dégustateurs, agents du DTA/IRSAT dont 4 ont été membres du jury précédent. Comme dans le cas précédent, l'aspect général, le goût et la flaveur des échantillons ont été appréciés puis les échantillons ont été classés par ordre de préférence. Les tendances suivantes ont été dégagées: les 5 dégustateurs ont trouvé que les quatre échantillons répondaient aux caractéristiques du *dolo* du point de vue du goût, de la flaveur et de l'aspect général. Pour ce qui concerne le classement selon la préférence, 1 dégustateur a porté son 1<sup>er</sup> choix sur les échantillons SF6.1a/L4 et SF8.2/L4, son 2<sup>ème</sup> choix sur l'échantillon SD1.8/L4 et 3<sup>ème</sup> choix sur l'échantillon ZN4.1/L4. Deux dégustateurs ont classé 1<sup>er</sup> l'échantillon SF8.2/L4, 2<sup>ème</sup> l'échantillon SF6.1a/L4, et 3<sup>ème</sup> les échantillons SD1.8/L4 et ZN4.1/L4. Deux autres dégustateurs ont trouvé les 4 échantillons tous acceptables et n'ont pas fait de classement particulier car ils les préfèrent tous.

#### **V.2.6.2 Les échantillons de *dolo* produits en unité de production**

Un total de 21 dégustateurs non entraînés dont 20 de sexe masculin, ont participé à l'évaluation sensorielle des 5 échantillons de *dolo* (ZN4.1/L4, SD1.8/L4, SF6.1a/L4, SF8.2/L4 et le *dolo* traditionnel DT) obtenus en unité de production. Ce jury était composé de 12 personnes consommant fréquemment le *dolo* (tous les 1 ou 2 jours), 5 personnes le consommant souvent (1 ou 2 fois/semaine) et 4 personnes le consommant rarement (1 ou 2 fois/mois). Après dépouillement, les tendances qui se sont dégagées sont les suivantes:

-Pour ce qui concerne le goût et l'arôme, il est ressorti que les 5 échantillons de *dolo* avaient tous le goût et l'arôme caractéristiques du *dolo*; tous les 21 dégustateurs ont relevé cela pour le *dolo* traditionnel DT; 20 dégustateurs l'ont noté pour les échantillons de *dolo* SD1.8/L4, SF6.1a/L4 et SF8.2/L4, et 19 dégustateurs pour l'échantillon ZN4.1/L4. Certains dégustateurs ont relevé un goût légèrement sucré pour les échantillons de *dolo* ZN4.1/L4 (17 dégustateurs), SD1.8/L4 (9 dégustateurs) et SF6.1a/L4 (8 dégustateurs) ; ces échantillons ont généralement été qualifiés de *dolo* doux ou pas suffisamment fermenté.

-Pour le classement selon le degré de préférence le *dolo* traditionnel DT a été le mieux apprécié car il a été classé au 1<sup>er</sup> rang par 7 dégustateurs; puis suivent les échantillons SF6.1a/L4 et SD1.8/L4 classés au 1<sup>ème</sup> rang par 5 dégustateurs et enfin les échantillons ZN4.1/L4 et SD8.2/L4 classés tous deux au 1<sup>er</sup> rang par 3 dégustateurs. Six (6) dégustateurs ont trouvé que les 5 échantillons étaient tous bons et similaires.

- En observations complémentaires, le *dolo* traditionnel DT a été qualifié de « plus léger » (8 dégustateurs), « fort » (7 dégustateurs), « piquant » (4 dégustateurs) ou « présentant une note atypique » (1 dégustateur). Le *dolo* SF6.1a /L4 a également été qualifié de « léger » (8 dégustateurs) et « piquant » (4 dégustateurs). Quatre (4) dégustateurs ont qualifié le *dolo* ZN4.1/L4 de « lourd »; de même, 2 dégustateurs ont attribué le même qualificatif au *dolo* SD1.8/L4.

En somme, les échantillons de *dolo* obtenus par fermentation contrôlée par les souches sélectionnées ont été appréciés de manière satisfaisante par le jury. Leurs caractéristiques organoleptiques apparaissent néanmoins inférieures à celles du *dolo* traditionnel. Après le *dolo* traditionnel, les échantillons de *dolo* SF6.1a/L4, SD1.8/L4 et SD8.2/L4 ont été mieux appréciés par rapport au *dolo* ZN4.1/L4.

### **V.3 Discussion**

Cette étude a permis d'explorer les possibilités d'utilisation des cultures bactériennes pour contrôler la fermentation lactique du moût du *dolo*. Elle a également montré que la suspension de farine de malt de sorgho utilisée pour la préparation des inocula lactiques, est un substrat favorable à une bonne croissance de *Lact. fermentum*, et pourrait être exploitée comme support pour la production de cultures starter lyophilisées ou déshydratées. En examinant le pouvoir acidifiant, les souches ZN4.1, SF6.1a et SF8.2 ont confirmé leur performance précédemment rapportée (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2008); par contre la souche SD1.8, bien qu'ayant montré une meilleure performance par rapport aux autres, a été en dessous de sa performance précédente. La croissance simultanée de *Lact. fermentum* et la levure L4 observée pendant la co-fermentation corroborent les résultats antérieurs (Sulma *et al.*, 1991; Halm *et al.*, 1996; Orji *et al.*, 2003; Muyanja *et al.*, 2003), et s'expliquerait par une association symbiotique des deux espèces. La co-fermentation semble favoriser la croissance de *Lact. fermentum*. Ainsi un développement simultané de bactéries lactiques et de levures a été observé en 24h de fermentation du *bushera* (boisson fermentée à base de malt de sorgho) marqué par une

augmentation de la biomasse de 5,5 log ufc/ml à 9,1log ufc/ml pour les bactéries lactiques et de 4,3log ufc/ml à 5,8 log ufc/ml pour les levures, puis une diminution du pH de 7,0 à 4,6 (Muyanja *et al.*, 2003). L'association symbiotique de ces deux espèces résulterait du fait que les bactéries lactiques créent un environnement acide favorable à la prolifération des levures, et ces dernières fournissent vitamines, acides aminés et autres facteurs de croissance indispensables au développement des bactéries lactiques (Gobbetti *et al.*, 1994).

En comparant le taux de sucres totaux de la farine de malt de sorgho (78%), la proportion farine/eau (15%) mise en œuvre pour l'extraction du moût non acidifié et la teneur en matière sèche soluble du moût non concentré (environ 8°Brix), on constate un faible rendement à l'extraction du moût. Ce rendement peut être amélioré par la recherche de conditions idéales pour optimiser l'action des amylases endogènes du malt de sorgho ou par l'utilisation d'amylases et autres hydrolases exogènes d'origine végétale ou microbienne pour une hydrolyse poussée de l'amidon et autres polysaccharides de la suspension de farine de malt sorgho. Ceci permettra d'améliorer la productivité de l'unité. L'augmentation de la teneur en matière sèche soluble (°Brix) observée pendant le chauffage de la suspension de farine de malt de sorgho qui résulte de l'hydrolyse de l'amidon gélifié par les amylases du malt, corrobore les observations de Yao *et al.* (1995) sur de la production du *tchapalo* en Côte d'Ivoire ; ces auteurs avaient conclu que l'essentiel de l'hydrolyse de l'amidon par les enzymes du malt de sorgho se faisait pendant le chauffage du culot.

Les résultats de l'évaluation sensorielle ont révélé que les échantillons de *dolo* produits avec les souches sélectionnées, bien qu'ayant enregistré une appréciation satisfaisante de la part des dégustateurs, ont présenté des caractéristiques organoleptiques inférieures à celles du *dolo* traditionnel. La fermentation lactique naturelle non contrôlée du moût du *dolo* traditionnel, implique plus d'une espèce bactérienne avec une diversité génétiques des isolats (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007) où chaque isolat contribue aux caractéristiques organoleptiques du moût. Il en est de même pour la levure locale utilisée pour la fermentation alcoolique, où une biodiversité des isolats a été également mise en évidence (van der Aa Kühle *et al.*, 2001; Glover *et al.*, 2005). Sur le plan alimentaire, le *dolo* obtenu par co-fermentation présenterait plus d'avantages, à cause des métabolites que généreraient les deux espèces et qui pourraient être intéressants sur le plan nutritionnel, organoleptique et sécurité sanitaire. La co-fermentation présente également un autre avantage qui est la disponibilité d'une culture starter mixte constituée de *Lact. fermentum* et de levure, à l'issu d'un premier essai de co-fermentation dans les unités de production de *dolo*. Une technique de collecte de la levure locale est déjà pratiquée par les dolotières, bien que celle-ci nécessite une amélioration pour assurer la qualité du starter et du produit fini. Pour ce qui

concerne la fermentation lactique par *Lact. fermentum*, la technique de « pied de cuve » pourrait être pratiquée par les dolotières, après un premier essai de fermentation par inoculation de *Lact. fermentum*.

Sur la base du procédé traditionnel, deux diagrammes de production du *dolo* par fermentation contrôlée avec des cultures starter ont été proposés: le premier diagramme qui est similaire à celui du procédé traditionnel, comporte une double fermentation lactique puis alcoolique; le second diagramme est relatif à une co-fermentation lactique et alcoolique d'un moût clarifié non acidifié. A priori, l'application du premier diagramme dans les unités de production de *dolo* ne devrait pas poser de contraintes majeures car il ne diffère du diagramme traditionnel que par l'introduction des cultures de *Lact. fermentum* pour la fermentation lactique du moût. Par contre le deuxième diagramme constitue une innovation et nécessite non seulement l'extraction d'un moût clarifié non acidifié mais également l'inoculation simultanée de cultures de *Lact. fermentum* et de levure de l'espèce *S. cerevisiae* pour la co-fermentation. La fermentation contrôlée par inoculation de cultures starter a engendré une réduction du temps de fermentation. En effet, dans le procédé traditionnel, l'acidification naturelle du moût dure 12-16h et la fermentation alcoolique du moût acidifié dure 9-12h selon les sites (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007), soit une durée totale de 21h-48h pour les deux fermentations. Un pH d'environ 3,5-3,8 est requis pour le moût final, pH favorable au développement des levures et à la fermentation alcoolique subséquente et donnant le goût et l'acidité désirés au *dolo*. Neuf (9) heures de fermentation lactique contrôlée par inoculation à 1% (v/v) d'inoculum de souches sélectionnées de *Lact. fermentum* ont été suffisantes pour atteindre ces pH, d'où une réduction du temps de fermentation de 3-7h, soit 25-44%. Par la co-fermentation, du *dolo* de caractéristiques comparables au *dolo* traditionnel a été produit en 12h contre 21-48h, durée des fermentations lactique naturelle et alcoolique du procédé traditionnel; il en résulte une réduction du temps de fermentation de 9-36h, soit 43-75%. Le temps mis pour la production du moût clarifié concentré et non acidifié utilisé comme substrat pour la co-fermentation devrait être pris en compte pour une meilleure appréciation de la réduction du temps de production. Des réductions du temps de fermentation dues à l'utilisation de cultures starter ont été rapportées par d'autres auteurs. Ainsi, Orji *et al.* (2003) ont expérimenté le brassage du *pito* nigérian au laboratoire avec une culture mixte de *Lact. plantarum* et *Saccharomyces cerevisiae* et ont rapporté une réduction du temps de fermentation de 2 jours. Halm *et al.* (1996) ont enregistré une réduction de 24 h du temps de fermentation de la pâte de maïs pour la production du *kenkey* avec une culture starter constituée de souches de *Lact. fermentum* et de *Saccharomyces cerevisiae*. Récemment, Viéra-Dalodé *et al.* (2008) ont produit du *gowé* (aliment fermenté à base de sorgho) en 7h de fermentation au lieu de

24h (procédé traditionnel) avec *Lact. fermentum* seule ou en combinaison avec *Kluyveromyces marxianus*.

Le présent travail est une première approche de l'utilisation de cultures starter dans la production du *dolo*. Il a permis d'avoir des données nécessaires non seulement à la standardisation du procédé de brassage du *dolo* mais également à la normalisation de cette boisson traditionnelle. Ce travail devrait cependant être complété et approfondi par d'autres études ultérieures comme par exemple :

- la réalisation d'un scale-up de production en unité pilote avec l'application des Bonnes Pratiques d'Hygiène (BPH) et des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), la caractérisation technologique, physico-chimique et microbiologique des produits intermédiaires et des produits finis pour une parfaite maîtrise des deux diagrammes de production proposés;

- la vulgarisation des diagrammes de production standardisés auprès des unités artisanales de production de *dolo* et/ou de promoteurs de nouvelles unités semi-industrielles de brassage du *dolo* ;

- l'étude de l'effet synergique de la combinaison de souches de *Lact. fermentum* sur la durée de la fermentation lactique et la qualité organoleptique du moût, de même que l'effet synergique de souches de levures sur la fermentation alcoolique et la qualité organoleptique du produit fini.

- le développement des cultures starter lyophilisées ou déshydratées pour faciliter leur utilisation et manutention par les utilisateurs.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette étude est une contribution à la connaissance des technologies et la microbiologie des produits fermentés traditionnels d'Afrique notamment le *dolo* et le *pito*, deux bières de sorgho. Elle a permis de: 1) décrire les procédés traditionnels de maltage de sorgho et de brassage du *dolo* et du *pito*, puis d'établir les diagrammes de production; 2) déterminer la succession et l'évolution des principaux groupes de microorganismes impliqués dans les différentes étapes de production, de la matière première aux produits finis; 3) suivre l'évolution du pH et/ou de l'acidité titrable de la matière première aux produits finis; 4) collecter et identifier les bactéries lactiques dominantes associées à ces technologies traditionnelles notamment celles responsables de l'acidification du moût du *dolo* et du *pito*; 5) déterminer les principales caractéristiques technologiques des bactéries et préciser leur rôle dans la technologie du *dolo* et du *pito*; 6) expérimenter l'utilisation de souches sélectionnées de bactéries lactiques et de levure dans la technologie du *dolo* par double fermentation lactique puis alcoolique et par une co-fermentation lactique et alcoolique, au laboratoire et en milieu réel de production, puis de proposer deux diagrammes de production ; 7) disposer de données scientifiques nécessaires pour la standardisation des procédés étudiés et pour l'élaboration de normes nationales sur le malt de sorgho et le *dolo*.

Les résultats obtenus permettent de dégager les conclusions suivantes:

- Au cours du maltage du sorgho, l'opération de trempage des grains dans l'eau est critique du point de vue microbiologique; la microflore originelle des grains de sorgho, notamment les bactéries lactiques prolifèrent, donnant un avantage quant à la prédominance de la flore lactique dans le malt final. Concomitamment, la croissance de la flore de contamination Gram-négatif, catalase-positif est inhibée. Le maltage du sorgho apparaît donc comme une combinaison entre un développement microbien notamment lactique et la physiologie du grain de sorgho en germination.

- *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici*, *Ped. pentosaceus*, *Weissella confusa*, *Enterococcus faecium* et *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* constituent les espèces dominantes associées au maltage traditionnel des grains de sorgho, avec une prédominance d'isolats de *Lact. fermentum* des grains de sorgho jusqu'au malt final en passant par le trempage et la germination. Les propriétés antimicrobiennes de certains isolats de *Lact. fermentum*, permettent de dire que l'utilisation de souches sélectionnées comme cultures starter pendant le trempage des grains permettrait d'améliorer la qualité bactériologique du malt final.



- Sur le plan technologie de fermentation, le brassage traditionnel de la bière de sorgho à partir du malt de sorgho peut être divisé en deux étapes: la production du moût fermentescible (moût final) avec une phase d'acidification puis la fermentation alcoolique du moût final par un starter de levure locale pour donner le *dolo* ou le *pito*.
- L'acidification du moût de la bière traditionnelle de sorgho selon les procédés de brassage *Mossi* et *Dagarti*, est une opération distincte qui résulte d'une fermentation lactique naturelle non contrôlée; *Lact. fermentum* est l'espèce dominante responsable de cette fermentation, associée à *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lact. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Ped. acidilactici*, avec une biodiversité génétique des isolats.
- Tout au long du brassage, les isolats de *Lact. fermentum* ont dominé la microflore du malt de sorgho, pendant l'empâtage et l'acidification du moût.
- Une proportion appréciable des isolats de *Lact. fermentum* issus du maltage du sorgho et du brassage du *dolo* et du *pito* ont la capacité d'inhiber la croissance de souches indicatrices de germes pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *L. innocua*, montrant que l'utilisation de tels isolats comme cultures starter depuis le stade initial du maltage c'est-à-dire le trempage des grains permettrait de limiter les risques de contamination et de contrôler la fermentation lactique tout au cours des procédés (maltage et brassage), d'assurer la sécurité sanitaire des produits et de préserver la santé du consommateur.
- Le rôle majeur de *Lact. fermentum* dans la technologie de brassage de la bière de sorgho (*dolo*, *pito*) est de fermenter le moût en abaissant son pH, en produisant des acides organiques, des substances antimicrobiennes, des polysaccharides exocellulaires (EPSs), créant ainsi les conditions favorables au développement des levures et à la fermentation alcoolique.
- Du point de vue pouvoir acidifiant, les isolats de *Lact. fermentum* ont montré une faible diversité en se répartissant en quatre groupes en fonction de leur taux d'acidification.
- L'utilisation de souches sélectionnées dans les groupes d'isolats les plus acidifiants (G1 et G2) a permis de réaliser la fermentation lactique contrôlée du moût en 6-9h au lieu de 12-16h pour la fermentation naturelle non contrôlée dans le brassage traditionnel.
- Les échantillons de *dolo* obtenus avec les souches sélectionnées ont enregistré une appréciation satisfaisante de la part de dégustateurs.

Le présent travail devra cependant être poursuivi et complété par d'autres études microbiologiques et technologiques notamment:

- l'identification des isolats de bactéries lactiques non identifiés associés au maltage du sorgho et au brassage du *dolo* et du *pito*, qui pourraient être de nouvelles espèces ;

- l'identification et l'étude des propriétés technologiques des isolats associés au maltage du sorgho à Ouagadougou ;
- l'identification des moisissures et bacilles sporulants Gram-positif catalase-positif observés pendant le maltage et pendant les premières étapes du brassage, puis l'étude de l'impact de leur développement sur la qualité du malt de sorgho;
- l'étude des bactéries lactiques non dominantes qui n'ont pas été prises en compte au cours de la présente étude et qui pourraient jouer un rôle dans la technologie du *dolo* et du *pito* ;
- l'utilisation d'autres techniques moléculaires d'identification pour vérifier et compléter ces résultats ;
- la réalisation d'un scale-up de production du *dolo* et du moût (en tant que boisson non alcoolisée) en unité pilote par inoculation de cultures starter de *Lact. fermentum* et de *Sacharomyces cerevisiae* avec l'application des Bonnes Pratiques d'Hygiène (BPH) et des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), la caractérisation technologique, biochimique et microbiologique de la matière première, des produits intermédiaires et des produits finis, le conditionnement/emballage des produits finis et la détermination de leur durée de conservation;
- la vulgarisation des résultats auprès des unités artisanales de production de *dolo* et / ou des promoteurs de nouvelles unités semi-industrielles de brassage du *dolo* ;
- l'étude de l'impact des taux d'ensemencement des inocula de *Lact. fermentum* et de *S. cerevisiae* sur la durée de fermentation lactique, alcoolique et la co-fermentation lactique et alcoolique du moût;
- l'étude de l'effet synergique de la combinaison de plusieurs souches de *Lact. fermentum* sur la fermentation lactique et sur la qualité organoleptique du moût, de même que l'effet synergique de plusieurs souches de *S. cerevisiae* sur la fermentation alcoolique et sur la qualité organoleptique du *dolo*;
- le développement de cultures starter à l'état lyophilisées ou déshydratées, plus pratiques pour les unités de production

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achi, O.K. (1990) Microbiology of obiolor, a Nigerian fermented non alcoholic beverage. *Journal of Applied Bacteriology* **69**, 321-325.
- Achi O.K. (2005) The potential for upgrading traditional fermented foods through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* **4**(5), 375-380.
- Adams M, R. (1998) Fermented weaning foods. In: J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods*. London Blackie Academic. pp 790-811.
- Adams M.R. and Moss M.O. (2008) *Food Microbiology*. Third Edition The Royal Society of Chemistry Cambridge, UK. pp 20-62.
- Agati, V., Guyot, J.P., Morlon-Guyot, J., Talamond, P. and Hounhouigan, D. J. (1998) Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize dough (mawè and ogi) from Benin. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 512-520.
- Agu, R. C. and Palmer, G. H. (1996). Enzymatic breakdown of endosperm proteins of sorghum at different malting temperatures. *Journal of the Institute of Brewing* **102**, 415-418.
- Agu R.C. and Palmer G.H. (1998) A reassessment of sorghum for lager-beer brewing. *Bioresource Technology* **66**, 253-261.
- Ahmed S.B., Mahgoub S.A. and Babiker B.E. (1996) Changes in tannin and cyanides contents and diastasic activity during germination and the effect of traditional processing on cyanide content of sorghum cultivars. *Food Chemistry* **56**(2), 159-162.
- Ahrné S. and Molin G. (1991) Spontaneous mutations changing the raffinose metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **60**, 87-93.
- Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. and El-Soda, M. (2004) Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology* **21**, 715-725.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-159.
- Amoa-Awua W.K.A., Appoh F.E. and Jakobsen M. (1996) Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima. *International Journal of Food Microbiology* **31**, 87-98.
- Annan N. T., Poll, L., Sefa-Deddeh S., Plahar W. A. and Jakobsen M. (2003) Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture maize dough. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 462-474.
- Aniche G.N. (1990). Studies on the effect of germination and drying conditions on the cyanide content of sorghum sprouts. *Journal of Food Technology* **27**(4), 202-204.
- Au P.M. and Fields M.L. (1981) Nutritive quality of fermented sorghum. *J. Food Sci.* **46**(2), 652-654.
- Axtell J. D., Kirleis A. W., Hassen M. M., D'Croz Mason N., Mertz E.T. and Munck L. (1981) Digestibility of sorghum proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* **78**, 1333-1335.
- Axelsson L. (2004) Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In: S. Salminen, A. von Wright & A. Ouwehand (Ed.) *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. Marcel Dekker Inc, New York. pp1-66.

- Bach Knudsen K.E., Munck L. and Eggum B.O. (1988) effect of cooking, pH and polyphenol level on carbohydrates composition and nutritional quality of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) food, ugali. *Br. J. Nutr.* **59**, 31-47.
- Back W. (1988) Biologische Säuerung. *Monatsschr. F. Brauwiss.* **41**, 152-156.
- Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W and Schleifer K-H. (1992) The prokaryotes. A Handbook on the Biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications Second Ed. Volume II. Springer-Verlag, New York.
- Bansha D., (1990) Traditional brewing of pito: Process and product characteristics. M. Phil Thesis, University of Ghana, Legon, Ghana.
- Billings T. (1998) On fermented foods. Available: <http://www.living-foods.com>.
- Blandino A., Al-Aseeri M.E., Pandiella S.S., Cantero D. and Webb C. (2003) Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* **36**, 527-543.
- Boivin P. and Malanda M. (1997). Improvement of malt quality and safety by adding starter culture during the malting process. *Technical-Quarterly, Master-Brewers Association of the Americas* **34**, 96-101.
- Booyesen, C., Dicks, L.M.T., Meijering, I. and Ackermann, A. (2002). Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. *International Journal of Food Microbiology* **76**, 63-73.
- Byrne H., Donnelly M. F. and Carrol M. B. (1993) A comparison of some properties of barley, wheat, triticale and sorghum malts. *In: Proceedings of the Fourth Scientific and Technical Convention of the Institute of Brewing. Central and Southern African Section, Somerset West, p.13.*
- Bottazzi V. (1988) An introduction to rod-shaped lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 303-315.
- Bougouma B. (1981) La bière de sorgho. Rapport de stage. ENSIA-SIARC, Montpellier, France, 50p.
- Bougouma B. (2002) Etude de l'empattage au cours du brassage du dolo. Mémoire de DEA, Université de Ouagadougou, Burkina Faso, 67p.
- Bounaix S. (1992) Taxinomie biochimique, physiologique et moléculaire d'une collection de souches de *Streptococcus thermophilus* et de *Streptococcus salivarius*. Thèse Université de Caen, France, 2 vol, 109p et 72p.
- Calderon Santoyo, M., Loiseau, G., Rodriguez Sanoja, R. and Guyot, J.P. (2003) Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and  $\alpha$ -amylase production at pH 4.0. *International Journal of Food Microbiology* **80**, 77-87.
- Campbell-Platt G. (1987). Fermented Foods of the World: A Dictionary and Guide. Butterworth, London, 291p.
- Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **87**, 113-130.
- Chavan, J. K. and Kadam, S. S. (1989). Nutritional improvement of cereals by fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **28**, 349-400.
- Chinyere I. I. and Onyekwere S. E. (1996) Nigerian indigenous fermented foods: their traditional process operation, inherent problems, improvements and current status. *Food Research International* **29**, 527-540.
- Chitsika J. M. and Mudimbu M.W. (1992) Quality Criteria for Opaque beer in Zimbabwe In: M. L. R. Gomez, L. M. House, L.M. Rooney and D.A.V. Dendy (Eds.) pp.151.

- Conway P. L. (1996) Selection criteria for probiotics microorganisms. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **5**, 10-14.
- Collins M.D., Farrow J.A., Phillips B.A., Feresu S. and Jones D.(1987) Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 310-316.
- Collins M.D., Rodrigues U.M., Ash C., Aguirre M., Farrow J.A.E., Martinez-Murcia A., Phillips B.A., Williams A.M. and Wallbanks S. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, 5-12.
- Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. and Wallbanks S. (1993) Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 595-603.
- Collins M.D. and Wallbanks S.(1992) Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rimae* and *Streptococcus parvulus*: proposal for the creation of a new genus *Atopobium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **92**, 235-240.
- Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., Gobbetti, M. (2001) Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeast from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of southern Italy. *International Journal of Food Microbiology* **64**, 95-104.
- Corwell R. R. (1970) Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* **104**, 410-433.
- Cooke R.D., Twiddy D.R. and Reilly P.J.A. (1987) Lactic acid fermentation as a low-cost means of food preservation in tropical countries. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 369-379.
- Curk M.C., Boeufgras J.M., Decaris B., Gavini F., Kersters K., Larpent J.P., Le Bourgeois P., Renault P., de Roissart H. et Rouvier C. (1994) In : H. De Roissart et F. M. Luguët (ed). *Bactéries lactiques*. Vol1. Loriga, Uriage, pp141-168.
- Dada I. O. and Dendy D.A.V. (1988) Cyanide content of germinated cereals and influence of processing techniques. In: D. Alnwick, S. Moses & O.G. Schmidt (ed.) *Improving young child feeding in eastern and southern Africa*. Nairobi, Kenya, Centre de Recherche pour le Développement International. pp. 359-365.
- Davidson, P.M. (1997) Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L. R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, DC, pp. 520-556.
- Decallone J., Delmee M., Wauthoz, P., El Lioui M. and Lambert R. (1991) A rapid procedure for the identification of lactic acid bacteria based on the gas chromatographic analysis of the cellular fatty acids. *J. Food Prot.* **54**, 217-224.
- Dellaglio F., Dicks L.M.T. and Torriani S. (1995) The genus *Leuconostoc* In: B.J.B Wood and W.H. Holzapfel (ed.) *The lactic Acid Bacteria Vol. 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London, UK. pp235-278.
- Demuyakor B. and Ohta Y. (1991) Characteristics of pito yeast from Ghana. *Food Microbiology* **8**, 183-193.
- Demuyakor B. and Ohta Y. (1992) Malt Characteristics of *Sorghum vulgare* Varieties from Ghana. *J. Sci Food Agric.* **59**, 457-462
- Devriese L. A., Collin M.D. and Wirth R. (1991) The genus *Enterococcus*. In A. Balows *et al.* (eds) *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, USA, pp. 1465-1481.
- De Vuyst, L. and Degeest, B. (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **23**, 153-177.

- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F. and Degeest, B. (2001) Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **11**, 687-707.
- Dewar J., Taylor J. R.N. and Berjak P. (1997) Determination of improved steeping conditions for sorghum malting. *Journal of cereal Science* **26**, 129-136.
- Dicks L. M. T., Dellaglio F. and Collins M. D. (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*[corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 395-397.
- Dicko M.H.(2005) Endogenous phenolics and starch modification enzymes as determinants of sorghum for food use in Burkina Faso. PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands. 174p.
- Dicko M. H., Hilhorst R., Gruppen H., Traoré A.S., Laane C., van Berkel W. J.H. and Voragen A.G.J. (2002) Composition of content in phenolic compounds, polyphenol oxidase and peroxidase in grains of fifty sorghum varieties from Burkina Faso. *Journal of Agriculture Food Chemistry* **50**, 3780-3788.
- Dirar H. A. (1978) A microbiology study of Sudanese Merissa brewing. *J. Food Sci.* **43**, 1683-1686.
- Doggett H (1988). Sorghum. 2<sup>nd</sup> Ed Longman Scientific and Technical, London.
- Doherty C., Faubion J.M. and Rooney, L.W. (1982). Semi automated determination of phytate in sorghum and sorghum products. *Cereal Chem.* **59**, 373-378.
- Drücker D.B. and Veazey F.J. (1977) Fatty acid fingerprints of *Streptococcus mutans* NCTC 10832 grown at various temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**(2), 221-226.
- Drücker D. B. and Owen I. (1973) Chemotaxonomic fatty acid fingerprints of bacteria grown with, and without, aeration. *Can. J. Microbiol.* **19**(2), 247-250.
- Ehrmann M.A. and Vogel R.F. (2005) Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food & Technology* **16**, 31-42.
- Efiuvwevwere, B. J. O. and Akona, O. (1995) The microbiology of kunun-zaki, a cereal beverage from northern Nigeria, during the fermentation (production) process. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**, 491-493.
- Ekundayo J.A. (1969) The production of pito, a Nigerian fermented beverage. *Journal of Food Technology* **4**, 217-225
- Eggum B.O., Monawar L., Knudsen K.E., Munck L. and Axtell J. (1983) Nutritional quality of sorghum and sorghum foods from Sudan. *Journal of Cereal Science* **1**, 127-137.
- Euzéby J.P. (2004). Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire: *Weissella* <http://www.bacteria.cict.fr/bacdico/ww/weissella.html>, 8-08-2007.
- Faparusi S. I. (1970) Sugar changes during the preparation of *Burukutu* beer. *J. Sci. Food Agric.* **21**, 79-81.
- Farshtchi D. and Mc Clung N. M. (1970) Effect of substrate on fatty acid production in *Nocardia asteroides*. *Can. J. microbial.* **16** (4), 213-217.
- Faparusi S. I., Olofinboba M. O. and Ekundayo J. A. (1973) The microbiology of *burukutu* beer. *Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie* **13**, 563-568.
- Farias M., Manca de Nadra M.C., Rollan G. C. and Strasser de Saad A.M. (1995) Effect of organic acids. *Current Microbiology* **31**, 15-18.
- FAO (1968) *Food Additives* **29**, 144-148.
- FAO (1995) Le sorgho et les mils dans la nutrition humaine. Rome, <http://www.fao.org/docrep/T0818F/T08818F00.htm>

- FAO (1999) Fermented cereals. A global perspective. Rome 98p.
- FAO (2005) Agricultural data: FAOSTAT. <http://www.faostat.fao.org/faost/default.jsp>
- Fields, M.L., Hamed, A. M. and Smith, D.K. (1981) Natural lactic acid fermentation of corn meal. *Journal of Food Science* **46**, 900-902.
- Flannigan B., Okagbue R. N., Khalid R. and Teoh C.K. (1982) mould flora of malt and storage. *Brewing and Distilling International* **12**, 31-33.
- Gaitan E., Lindsay R.H., Reichert R. D., Ingbar S.H., Cooksey R.C., Legan J., Meydrech E.F., Hill J. and Kubota K. (1989) Antithyroid and goitrogenic effects of millets: role of c -glycosyl flavones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **68**, 707-714.
- Galzy P. et Moulin G. (1991) Les transformations microbiologiques des produits céréaliers. In: B. Godon (Ed) Biotransformation des produits céréaliers. Technique & Documentation, Paris, pp 162-187.
- Garvie E.I.(1984) Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *Meth. Microbiol.* **16**, 147-178.
- Garvie E.I. (1986a) Genus *Leuconostoc* In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1071-1075.
- Garvie E.I. (1986b) Genus *Pediococcus* Claussen 1903, 68<sup>AL</sup>. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2, Williams, Wilkins, Baltimore. pp. 1075-1079.
- Garai G., Dueñas M. T., Irastorza A. and Moreno-Arribas M.V.(2007) Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology* **45** (5), 473-478.
- Gassem, M.A.A. (1999) Study of micro organisms associated with the fermented bread (khamir) produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia. *International Journal of Food Microbiology* **86**, 221-225.
- Giraud, E., Champailier, A. and Raimbault, M. (1994) Degradation of raw starch by wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* **60** (12), 4319-4323.
- Glennie C. W. and Wight A.W. (1986) Dextrins in sorghum beer. *J. Inst. Brew.*, **92**, 384-386
- Gloria M. B. A. and Izquierdo-Pulido M. (1999) Levels and significance of biogenic amines in Brazilian beers. *Journal of Food Composition and Analysis* **12**, 129-136.
- Glover, R.L.K., Abaidoo, R. C., Jakobsen, M. and Jespersen, L. (2005) Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from a survey of pito production sites in various parts of Ghana. *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 755-761.
- Gobbetti M., Corsetti A. and Rossi J. (1994a) The sourdough microflora. Interaction between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 275-279.
- Gobbetti M., Corsetti A. and Rossi J. (1994b) The sourdough microflora. Interaction between lactic acid bacteria and yeast: metabolism of carbohydrates. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 456-460.
- Graham G.G., MacLean W.C. and Morales E.(1986) Digestibility and utilization of protein and energy from 'nasha' a traditional Sudanese fermented sorghum weaning food. *Journal of Nutrition* **116**, 978-984
- Gregersen, T. (1978) Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology* **5**, 123-127.

- Grimont, F. and Grimont, P.A.D.(1986) Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annales de l'Institut Pasteur*, **137B**, 165-175.
- Guiraud J.P. (1998) *Microbiologie Alimentaire*. DUNOD, Paris. France. pp 282-295.
- Haard N. F., Odunfa S. A., Lee C. H., Quintero-Ramirez R., Lorence-Quinones A. and Wachter-Radarte C.(1999) Fermented cereals. A global perspective. *FAO Agricultural Services Bulletin*, **138**.
- Haggblade, S. and Holzapfel, W. H. (1989) Industrialization of Africa's indigenous beer brewing. *In: Steinkraus K. H. (Ed.), Industrialization of Indigenous Fermented Foods*, 33. Marcel/ Dekker, New York, pp.191-283.
- Haikara, A. and Laitila, J. (1995). Influence of lactic acid bacteria starter cultures on the quality of malt and beer. *In Proceedings of 25<sup>th</sup> Congr. Eur. Brew. Conv. Brussels*; Oxford University Press, 249-256.
- Hamad A. and Fields M.L. (1979) Evaluation of protein quality and available lysine of germinated and ungerminated cereals. *Journal of Food Science* **44**, 456-459.
- Hamad, S. H., Dieng, M. C. Ehrmann, M. A. and Vogel, R. F. (1997) Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 764-770.
- Hammes W.P., Weiss N. and Holzapfel W.P.(1992) The genera *Lactobacillus* and *Carbobacterium*. *In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.H. Schleifer (Eds.), The prokaryotes. A hand-book on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Application*. Springer-Verlag, NewYork. pp.1535-1594.
- Hammes W.P. and Vogel R.F.(1995) The genus *Lactobacillus* *In: B.J.B. Wood & W.H. Holzapfel (Eds.), The genera of lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria, Vol.2*. Blackie Academic & Professional, Glasgow, Scotland. pp. 19-54.
- Halm, M., Lillie, A. Sørensen, A. K. and Jakobsen M. (1993) Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize dough for kenkey production in Ghana. *International Journal of Food Microbiology* **19**, 135-143.
- Halm M., Osei-Yaw A., Hayford A., Kpodo K. A. and Amoah-Awua W.K.A. (1996) Experiences with the use of a starter culture in the fermentation of maize for 'kenkey' production in Ghana. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**, 531-536.
- Hatfield R.D., Wilson J.R., Mertens D.R.(1999) Composition of cell walls isolated from cell types of grain sorghum stems. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 891-899.
- Hardie J. M. (1986) Other Streptococci. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.2, Williams, Wilkins, Baltimore, pp.1068-1071.
- Hayford, A.E., Petersen, A., Vogensen, F. K. and Jakobsen, M. (1999) Use of conserved randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments and RADP pattern for characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian fermented maize dough. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 3213-3221.
- Helm D., Labischinski H., Schallen G. and Naumann D. (1991) Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 69-79.
- Herber J.P.(2003) La bière et le dolo en pays dogon: origine, savoir-faire et phénomène social. <http://www.museum.agropolis.fr/pages/savoirs/bieres/hvoyages2>.
- Holzapfel W. H. (1997) Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* **8**, 241-258.
- Holzapfel W. H. (2002) Appropriated starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* **75**, 197-212.



- Holzappel W. H., Geisen R. and Schillinger U. (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* **24**, 343-362.
- Holzappel W. H., Haberer P., Björkroth J. and Schillinger U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* **73** (suppl), 365S-373S.
- Holzappel, W. H. and Schillinger U. (1991) The Genus *Leuconostoc* In A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (Eds.), The prokaryotes. A hand-book on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification and application. Springer-Verlag, New York. pp 1508-1534.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis in't Veld, J.H.J. (1998) Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* **41**, 85-101.
- Holzappel W.H. and Wood B. J. B. (1995) Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In: B.J.B Wood & W.H. Holzappel (Eds.), The genera of lactic acid bacteria Vol2, Blackie Academic & Professional, London, UK. pp1-6.
- Hounhouigan, D.J., Nout, M.J.R., Nago, C.M., Houben, J.H. and Rombouts, F.M. (1993a) Characterization and frequency distribution of lactic acid bacteria involved in the processing of mawè, a fermented maize dough from Benin. *International Journal of Food Microbiology* **18**, 279-287.
- Hounhouigan, D.J., Nout, M.J.R., Nago, C.M., Houben, J.H. and Rombouts, F.M. (1993b) Composition and microbiological and physical attributes of mawè, a fermented maize dough from Benin. *International Journal of Foods Science and Technology* **28**, 513-517.
- Hounhouigan J.D. (2003) La valorisation des céréales locales pour les marchés urbains en Afrique de l'ouest: atouts, contraintes et perspectives In : Proceeding 2<sup>nd</sup> International Workshop: Food-based approaches for a healthy nutrition, Ouagadougou, Burkina Faso, 23-28 November. pp 359-368.
- Hulse J.H., Laing E.M. and Pearson O.E. (1980) Sorghum and the millets: their composition and nutritive value. Academic Press, New York, 997 p.
- Ilori M. O., Fessehazion B., Olajuyigbe A.O., Babalola G. O. and Ogundiwin J. O. (1991) Effect of malting and brewing processes on the microorganisms associated with sorghum grains and malt. *Master Brewers Association of the Americas (MBAA) Technical Quarterly* **28**, 45-49.
- Inyang C.U. and Dabot Y.A. (1997) Storability and portability of pasteurized and sterilized kunun-zaki, a fermented sorghum beverage. *J.Fd. Process. Preserv.* **21**, 1-7.
- Jackman P.J.H. (1987) Microbial systematics based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: R.R. Colwell & R. Grigorova (Eds.) *Methods in Microbiology* Vol.19, Academic Press, London, UK, pp.209-225.
- Jambunathan R. and Subramanian V. (1988) Grain quality and utilization of sorghum and pearl millet. In: Biotechnology in tropical crop improvement. Proceedings of the International Biotechnology Workshop, Patancheru, Inde, 12-15 Janvier 1987, Patancheru, ICRISAT. pp. 133-139.
- Johansson, M. L., Sanni, A., Lonner, C. and Molin, G. (1995) Phenotypically based taxonomy using API 50 CH of lactobacilli from Nigeria Ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *International Journal of Food Microbiology* **25**, 159-168.
- Kandler O. and Weiss N. (1986a) Regular non-sporing Gram-positive rods. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2, Williams, Wilkins, Baltimore. pp. 1208-1209.
- Kandler O. and Weiss N. (1986b) Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212<sup>AL</sup> In P.H.A. Sneath N.S. Mair M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp. 1209-1234.

- Kazanas N. and Fields M.L. (1981). Nutritional improvement of sorghum by fermentation. *Journal of Food Science* **46**, 819-821.
- Kayode, P.A.P., Adegbidi, A., Linnermann, A.R., Nout, R.M.J. and Hounhouigan J.D. (2004) Consumers' quality perception of farmers' varieties of sorghum and derived foods in Benin. IN: Brouwer, I. D., Traore, S. A., Trêche, S.(Eds). Proceedings of the 2<sup>nd</sup> international workshop on Food based approaches for healthy nutrition in West Africa, Ouagadougou, Burkina Faso. 23-28 November 2003. pp 90-105.
- Kelly, L. and Briggs, D.E.(1992). The influence of grain microflora on the germinative physiology of barley. *Journal of the Institute of Brewing* **98**, 395 - 400.
- Kimario V. M., Massawe G. A., Olasupo N. A. and Holzapfel W. H. (2000) The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of "kivunde", a traditional Tanzanian food product. *International of Food Microbiology* **56**, 179-190.
- Kingamko, R., Sjogren, E., Svanberg, U. and Kaijser, B.(1994). pH and acidity in lactic fermenting cereal gruels: effects on viability of enteropathogenic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **10**, 664-669.
- Klaenhammer T.R., Barrangou R., Logan Buck B. and Azcarate-Peril M.A. (2005) Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol.Rev.* **29**, 393-409.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C. and Reuter G. (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **41**, 103-125.
- Knoshaug, E. P. Ahlgrent, J. A. and Trempey, J. E. (2000) Growth associated exopolysaccharide expression in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ropy 352. *Journal of Dairy Science* **83**, 633.
- Köhler G. Ludwig W. and Schleifer K. H. (1991) Differentiation of lactococci by rRNA gene restriction analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **84**, 307-312.
- Konlani, S., Delgenes, J.P., Moletta, R., Traoré, A., Doh, A. (1996) Isolation and physiological characterization of yeasts involved in sorghum beer production. *Food Biotechnology* **10**, 29-40.
- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Schillinger, U., Hertel, C. Holzapfel, W. H. and Franz, C.M.A.P. (2005). Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for preparation of Gari, a traditional African food. *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 527-540.
- Kunene, N.F., Geornaras, I., von Holy, A., and Hastings, J.W. (2000) Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1084-1092.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lancefield, R. C. (1933) A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine* **59**, 571-595.
- Lane D. J., Pace B., Olsen G.L., Stahl D.A., Sogin M.L and Pace N.R. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A **82**(20), 6955-6959.
- Lechevalier M.P. (1977) Lipids in bacterial taxonomy - a taxonomist's view. *CRC Critical Review in Microbiology* **5**(2), 109-210.
- Lee C.H. (1997) Lactic acid fermentation and their benefits in Asia. *Food Control* **8**, 259-269.

- Lefyedi M.L.(2006) Control of microbial proliferation on sorghum during malting. PhD Food Science, University of Pretoria, South Africa. 118p (available at <http://www.upetd.up.ac.za/Thesis/available/etd-06082007-17321>)
- Lei, V. and Jakobsen, M. (2004) Microbiological characterization and probiotic potential of *koko* and *koko sour water*, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 384-397.
- Leisner, J. J., Vancanneyt, M., Goris J, Christensen H. and Rusul G. (2000) Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. Nov., a new lactic acid bacterium isolated from chilli bo, a Malaysian food ingredient. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 19-24.
- Leuschener R. G., Heidel M. and Hammes W. P. (1998) Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **39**, 1-10.
- Lewenstein, A. Frigerio G. and Monori M. (1979) Biological properties of SF 68, a new approach in the treatment of diarrheal diseases. *Curr. Therap. Res.* **26**, 967-891.
- Lonvaud-Funel A. (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**, 9-13
- Lonvaud-Funel A. et Desens C. (1990) Constitution en acides gras des membranes des bactéries lactiques du vin. *Science des aliments* **10**, 3362-3364.
- Lucas P., Landete J., Coton M., Coton E., Lonvaud-Funel A. (2003) The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria *FEMS Microbiology Letters* **229** (1), 65-71.
- Mackay A.D., Taylor M. B., Kibbler C.C. and Hamilton-Miller J.M.T.(1999) *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clinical Microbiology and Infections* **5**, 290-292.
- Mahgoub S.E.O. and Elhag S.A. (1998) Effect of milling, soaking, malting, heat treatment and fermentation on phytate level of flour Sudanese sorghum cultivars. *Food Chemistry* **61**, 77-80.
- Malleshi N.G., Daodu M.A., and Chandrasekhar A.(1989). Development of weaning food formulations based on malting and roller drying of sorghum and cowpea. *International Journal of food Science and Technology* **24**, 511-519.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**, 208-218.
- Mandjeka J.C.A. (2002) Etude du diagramme de production du dolo et caractérisation biochimique des produits intermédiaires. Mémoire de Maîtrise en Sciences et Techniques Option Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine. UFR/SVT, Université de Ouagadougou, Burkina Faso, 39p.
- Martin, J. D. and Mundt J. O. (1972) Enterococci in insects. *Appl. Microbiol.* **24**, 575-580.
- Martensson, O., Duenas-Chasco, M., Irastorza, A. R. O. and Holst, O. (2003) Comparison of growth characteristics and exopolysaccharide formation of two lactic acid bacteria strains, *Pediococcus damnosus* 2.6 and *Lactobacillus brevis* G.77, in an oat-based, non-dairy medium. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **36**, 353-357.
- Mattila-Sandholm T. (1998) VTT on lactic acid bacteria. *VTT Symposium*, **156**, 1-10.
- Mbofung, C. M. F. and Fombang, E. N. (2004). Improving the digestibility and availability of nutrients from sorghum flour through improved malting techniques. In: Brouwer I. D., Traore S. A., Trèche S.(Eds). Proceedings of the 2<sup>nd</sup> international workshop on Food based approaches for healthy nutrition in West Africa, Ouagadougou, Burkina Faso. 23-28 November 2003. pp 489-502.

- Mbugua, S.K. and Njenga, J. (1992). The antimicrobial activity of fermented uji. *Ecology of Food and Nutrition* **28**, 191-198.
- McClelland M., Jones R., Patel Y. and Nelson M. (1987) Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **15**, 5985-6005.
- Mensah, P., Thomkins, A. M., Prasar B. S. and Harrison, T. J. (1991) Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 203-210.
- Miller G.L. 1956 Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* **31**, 426-428.
- Milliere, J. B., Mathot A.G., Schmitt, P. and Divies C. (1989) Phenotypic characterisation of *Leuconostoc* species. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 529-542.
- Mital B.K., Schallenberger R.S. and Steinkraus K.H. (1973) Alpha galactosidase activity of lactobacilli. *Appl. Microbiol.* **26**, 783-788.
- Motarjemi Y., (2002). Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* **75**, 213-229.
- Morero L.M., payumo E.M., Aguinalpo A.R., Matsumoto I. and Homma S. (1991) Anti-nutritional factor in weaning foods prepared from germinated cereals and legumes. *Food Sci. technol-Leb* **24**, 177-181.
- Mugula J.K., Nawhus J.A., Sorhaug T. (2003) Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of *togwa*, a Tanzanian fermented food. *International Journal of Food Microbiology* **83**, 307-318.
- Murray R. G. E., Brenner D. J., Colwell R. R., De Vos P., Goodfellow M., Grimont P.A.D., Pfenning N., Stackebrandt E. and Zavarzin G.A. (1990). Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 213-215.
- Muyanja, C.M.B.K., Narvhus, J.A., Treimo, J. and Langsrud, T. (2003). Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from *bushera*: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology* **80**, 201-210.
- Nanadoum M. (2001) La «bili bili», bière traditionnelle tchadienne: Etudes technologiques et microbiologiques. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, INA PG, Paris, France, 171p.
- Naumann D. Helm D. and Labischinski H. (1991) Microbiological characterisation by Fournier-transform infrared spectroscopy. *Nature* **351**, 81-82.
- Newton C.R. and Graham A. (1994) PCR-Introduction to biotechniques. BIOS Scientific Publishers Limited. St Thomas House, Becket Street, Oxford OX1 1SJ, U K.
- NF V03-050 (1970) Produits agricoles alimentaires - Directive générale pour le dosage de l'azote avec minéralisation selon la méthode de Kjeldahl.
- NF V03-707 (2000) Céréales et produits céréaliers – Détermination de la teneur en eau – Méthodes de référence pratique.
- NF V03-760 (1981) Céréales, légumineuses et produits dérivés Détermination des centres – Méthode par incinération à 550°C.
- Nigatu A. (2000) Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 969-978.
- Nso E. J., Ajebesome P. E., Mbofung C. M. and Palmer G. H. (2003) Properties of three Sorghum cultivars used for the production of *bili-bili* beverage in Northern Cameroon. *J. Inst. Brew.* **109** (3), 245-250.
- Novel G. (1993) Les bactéries lactiques. In J.Y. Leveau & M. Bouix (eds) *Microbiologie Industrielle: les microorganismes d'intérêt industriel*. Technique&Documentation, Lavoisier, APRIA, Paris. pp169-374.

- Novellie L.(1968) Bantu beer; food or beverage? *Food Ind. South Africa* **16**, 28.
- Novellie L. (1977) Beverages from sorghum and millets. In D.A.V. Dendy (Ed.) Proceeding of a Symposium on sorghum and Millets for Human Food. Tropical Products Institute, London, pp.73-77.
- Novellie L. and De Schaepdrijver P. (1986) Modern developments in traditional African beers. *Progress in Modern Industrial Microbiology* **23**, 73-157.
- Nout M.J.R.(1980) Microbiological aspects of the traditional manufacture of *Busaa*, a Kenyan opaque maize beer. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **6**, 137-142.
- Nout, M.J.R. (1991) Ecology of accelerated natural lactic fermentation of sorghum-based infant food formulas. *International Journal of Food Microbiology* **4**, 293-301.
- Nout M.J.R. and Motarjemi Y. (1997) Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety: a joint FAO/WHO workshop. *Food Control* **8**, 221-226.
- Nout M. J. R. and Sarkar P. K.(1999) Lactic acid food fermentation in tropical climates. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, 395-401.
- Nout M.J.R., Niche P.F. and Hollman P.C.H. (1994) Investigation of the presence of biogenic amines and ethyl carbamate in kenkey made from fermented maize and maize-cowpea mixtures as influence by process conditions. *Food Addit. Contam.* **11**, 397-402.
- Noots I., Delcour L. and Michiels C. W. (1999). From field barley to malt: detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Critical Review in Microbiology* **25**, 121-153.
- Odufa, S.A. (1985) African fermented Food. In: B.J.B. Wood (Ed.), Microbiology of fermented Food. Vol.2, Elsevier Applied Science Publishers Ltd. Essex, England, pp.155-191.
- Odufa S.A. and Adeyele S. (1987) Sugar changes in fermenting sorghum during preparation of ogi-baba gruel. *J. Food Agric.* **2**, 95-98.
- Odufa, S. A. and Adeyele, S. (1985) Microbiological changes during the traditional production of ogi-baba, a West African fermented sorghum gruel. *Journal of Cereal Science* **3**, 180-193.
- Ofuya C.O., Nnajiakor C. (1989) development and evaluation of a starter culture for the industrial production of gari. *Journal of Applied Bacteriology* **66**, 37-42.
- Ogundiwin, J.O., Ilori, M.O., Fessehatzion B., Babalola G., O. and Olajuyigbe, A. O. (1991). Effect of chemical treatments on the micro-organisms associated with malting of sorghum grains and sorghum malt. *Journal of Applied Bacteriology* **71**, 139-143.
- Olasupo, N.A., Olukaya, D.K. and Odufa, S. A. (1997) Identification of lactobacillus species associated with selected African fermented foods. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung* **52c**, 105-108.
- Olsen A., Halm M. and Jakobsen M. (1995) The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 506-512.
- Ollitrault, P., Escoute, J. and Noyer, J.L. (1989) Polymorphisme enzymatique des sorghos. 1. Description de 11 systèmes enzymatiques - Déterminisme et liaisons génétiques. *Agron. Trop.* **44**: 203-210.
- Öner Z., Sagdic O. and Simsek B. (2004) Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheeses. *Eur. food Res. Technol.* **219**, (5) 455-459.
- Onyeka U. and Dibia I. (2002) Malted weaning food made from maize, soybean, groundnut and banana. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**, 513-516.

- Orizoba I.C. and Atii J.V. (1991). Effect of soaking, sprouting, fermentation and cooking on nutrient composition and some anti-nutritional factors of sorghum (Guinesia) seeds. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **41**, 203-212.
- Orji M.U., Mbata T.I., Aniche G.N. and Ahonkhai I. (2003) The used of starter cultures to produce 'Pito', a Nigerian fermented alcoholic beverage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**, 733-736.
- Orla-Jensen S. (1919) The lactic acid bacteria. Host & Son, Copenhagen
- Orsini, F., Ami, D., Villa, A. M., Sala, G., Bellotti, M. G., & Doglia, S. M. (2000). FT-IR microspectroscopy for microbiological studies. *Journal of Microbiological Methods* **42**, 17-27.
- Owuama I. and Asheno I. (1994) Study of malting conditions for sorghum. *Food Chemistry* **49**, 257-260.
- Oyewole O.B. (1990) Optimization of cassava fermentation for fufu production: effect of single starter cultures. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, 49-54.
- Oyewole O. B. (1997) Lactic fermented foods in Africa and their benefits. *Food Control* **8**, 289-297.
- Padmaja G., George M. and Moorthy S. N. (1993) Detoxification of cassava during fermentation with mixed culture. *J. Sci. Food Agric.* **63**, 473-481.
- Paludan-Müller C., Madsen M., Sophanodora P., Gram L. And P. L. Moller (2002). Fermentation and microflora of *plaa-som*, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. *International Journal of food Microbiology* **73**, 61-70.
- Panasiuk O. and Bills D.D. (1984). Cyanide content of sorghum sprouts. *J. Food Sci.* **49**, 791-793.
- Pardo I., Garcia M.J., Zuniga M. and Uruburu F. (1988) Evaluation of the API 50 CHL system for identification of *Leuconostoc oenos*. *American Journal of Oenology and Viticulture* **39**(4), 347-350.
- Parr A. J. and Bolwell G. P. (2000) Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 985-1012.
- Pidoux, M., Marshal, V. M., Zanoni, P. and Brooker, B. (1990) Lactobacilli isolated from sugar kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. *Journal of Applied Bacteriology* **69**, 311-320.
- Priest F.G. and Campbell I. (1996). *Brewing Microbiology*. Second edition. Chapman and Hall, London, pp. 114-119.
- Priest F. G. and Pleasants J. G. (1988) Numerical taxonomy of some leuconostocs and related bacteria isolated from Scotch whisky distilleries. *J. Appl. Bacteriol.* **64**, 379-388.
- Purseglove J.W. (1972) *Tropical crops: monocotyledons*, Vol. 1. Longman Group Limited, Londres, 334 p.
- Rautio M., Jousimies-Somer H., Kauma H., Pietarinen I., Saxelin M., Tynkkynen S. and Koskela M. (1999) Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clinical Infectious Diseases* **28**, 1159-1160.
- Rodas A.M., Ferrer S. and Pardo I. (2005) Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 197-207.
- Rolle R. and Satin M. (2002) Basic requirements for the transfer of fermentation technologies to developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* **75**, 181-187.
- Rooney L.W. (1978) Sorghum and pearl millet lipids. *Cereal Chem.* **55**, 584-590.
- Rooney L.W. and Serna-Saldivar S.O. (1991) Sorghum. In: K. L. Lorenz & K. Kulps (Ed.). *Handbook of cereal Science and Technology*. Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 233-270.

- Rooney L.W. and Waniska R.D. (2004). Food and Nutritional Quality of Sorghum and Millet. Report Project TAM-226. Texas A&M University, College Station, Texas, USA.
- Rubayiza M. (1998) Développement de la valeur dans les filières sorgho et manioc par production de bières et sirops, et par valorisation alimentaire des drêches. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, INPL Nancy, France, 149p.
- Reed JD (1995) Nutritional toxicology of tannins and related. polyphenols in forage legumes. *J. Ani. Sci.* **73**, 1516-1528.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K. B. and Erlich H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Sciences* **239**, 487-491.
- Salovaara H. (2004) Lactic acid bacteria in cereal-based products *In: S. Salminen, A. von Wright & A. Ouwehand (Ed.), Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 3ème Ed, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc. New York Basel pp 431-452.*
- Salovaara H. and Simonson L. (2003) Fermented cereal-based functional foods. *Handbook of Fermented Food and Beverages*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Salunkhe D.K., Chavan J.K. and Kadam S.S. (1990) Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton, Floride, Etats-Unis, CRC Press.
- Sanger F., Nicklon S. and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, **74**, 5463-5467.
- Sanni A. I. (1993) The need for process optimization of African fermented foods and beverages. *International Journal of Food Microbiology* **18**, 85-95.
- Sanni A.I. and Lonner C. (1993) Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiology* **10**, 517-523.
- Sanni, A. I., Morlon-Guyot, J. and Guyot, J. P. (2002) New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigeran traditional fermented foods. *International Journal of Food Microbiology* **72**, 53-62.
- Sanni A. I. and Oso B. A. (1988) The production of agad-agidi a Nigerin fermented beverage. *Nahrung* **32**, 557-562.
- Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, I.H.N. and Traore, A.S. (2004) Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition* **3**, 174-179.
- Sawadogo-Lingani, H., Lei, V., Diawara, B., Nielsen, D. S., Møller, P.L., Traoré, A.S. and Jakobsen, M. (2007) The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort, for production of sorghum beer. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 765-777.
- Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Traoré A.S. and Jakobsen, M. (2008) Technological properties of *Lactobacillus fermentum* involved in the processing of dolo and pito, West African sorghum beers, for the selection of starter cultures. *Journal of Applied Microbiology* **104**, 873-882.
- Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Traoré A.S. and Jakobsen, M. (2010) Predominant lactic acid bacteria associated with the traditional malting of sorghum grains. *African Journal of Microbiology Research* **4**(3), 169-179.
- Schillinger U., Holzapfel W.H. and Kandler O. (1989) Nucleic acid hybridization studies on *Leuconostoc* and heterofermentative lactobacilli and description of *Leuconostoc amelibiosum* sp.nov. *System. Appl. Microbiol.* **12**, 48-55.
- Schillinger U. and Lücke, F. K. (1989) Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1901-1906.

- Schleifer K. H. and Kilpper-Bälz R. (1984) Transfer of *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis* to the genus of *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb.nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J. Syst. Bacteriol.* **34**, 31-34.
- Schleifer K. H. and Kilpper-Bälz R. (1987) Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* **10**, 1-19.
- Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Balz R., Collins M.D. and Fischer W (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *System. Appl. Microbiol.* **6**, 183-195.
- Schwartz D., Saffran W., Welsh J., Haas R., Goldenberg M. and Cantor C. (1983) New techniques for the purification of DNA's and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47**, 189-195.
- Schwartz H. M. (1956) Kaffircorn malting and brewing studies. I-The Kaffir beer brewing industry in South Africa. *J. Sci. Food Agric.* **7**, 101-105.
- Sefa-Dedeh (1991) Cereal-based traditional beverages from Ghana: process and product characteristics of pito. In: A. Westby & P.J.A. Reilly (Eds.), Proceedings of IFS regional Workshop on African Traditional Foods: Quality and Nutrition. Dar Es Salaam, Tanzania. pp1-7.
- Sefa-Dedeh S. and Asante S. (1988) Traditional alcoholic beverages from cereals in Ghana: processing of pito and brukutu in the greater Accra Region, Ghana. KIFP in Food System Research Report, N°1, 39p.
- Sefa-Dedeh S., Sanni A.I., Tetteh G. and Sakyi-Dawson E.(1999) Yeast in the traditional brewing of pito in Ghana. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **15**, 593-597.
- Serna-Saldivar S. and Rooney L. W. (1995) Structure and Chemistry of sorghum and Millets. In: D.A.V. Dendy (Ed.) Sorghum and Millets: Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists. Minnesota, USA. pp. 69-124.
- Seseña, S., Sánchez, I. and Palop, L. (2004) Genetic diversity (RAPD-PCR) of lactobacilli isolated from «Almagro» eggplant fermentation from two seasons. *FEMS Microbiology Letters* **238**, 159-165.
- Sikkema, J. and Oba, T. (1998) Extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria. Snow Brand R&D reports, **107**, 1-31.
- Silla Santos, M.H. (1996) Biogenic amines: their importance in food. *Int. J. Food. Microbiol.* **29**, 213-231.
- Simango C. (1997) Potentiel use of traditional fermented foods for weaning in Zambabwe. *Journal of Social Science and Medecine* **44**, 1065-1068.
- Simango, C. and Rukure, H. (1992) Survival of bacterial enteric pathogens in traditional fermented foods. *Journal of Applied Bacteriology* **73**, 37-40.
- Simpson, W.J. and Taguchi, H. (1995) The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. In Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H. (Ed.), The Genera of Lactic Acid Bacteria. Volume 2, Blackie Academic & Professional, Glasgow, pp. 125-172.
- Smith C. L. and Condemine G. (1990) New approaches for physical mapping of small genomes. *J. Bacteriol.* **172**(3), 1167-1172.
- Soni S. K. and Sandhu D. K. (1990) Indian fermented foods: microbiological and biochemical aspects. *Indian Journal of Microbiology* **30**, 135-157.
- Sriranganathan N., Seidler R.J. and Sandine W.E. (1985) Nucleic acids of species of *Lactobacillus*. *J. Dairy Sci.* **68**, 1077-1086.



Stamer J. R. (1975) Recent developments in the fermentation of sauerkraut. *In* J. G. Carr, C. V. Cutting & G. C. Whiting (eds.) *Lactic acid bacteria in beverages and food*. Academic Press, London. pp 267-280.

Steinkraus K.H. (1995) Classification of Household Fermentation Techniques. Background paper of WHO/FAO Workshop on Assessment of Fermentation as Household Technology for improving Food Safety. Dec.11-15, 1995. Department of Health, Pretoria, South Africa.

Steinkraus K. H. (1996) *Handbook of Indigenous fermented foods*. 2<sup>nd</sup> edition revised and enlarged. Marcel Dekker. New York, 776p.

Steinkraus K.H. (1998) Bio-enrichment production of vitamins in fermented foods. *In*: World BJB (ed.) *Microbiology of fermented foods*. Vol 2. 2<sup>nd</sup> Ed. Blackie Academic, London, pp 603-622.

Steinkraus K.H. (1997) Classification of fermented foods: world-wide review of household fermentation techniques. *Food Control* **8**, 311-317.

Steinkraus K.H. (2002) Fermentation in world food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **1**, 23-32.

Stiles, M. E. (1989) Less recognized or presumptive foodborne pathogenic bacteria. *In* M.P. Doyle (Ed.) *Foodborne bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp.673-733.

Stiles M.E. and Holzapfel W. H.(1997) Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**, 1-29.

Stackebrandt E. and Liesack W. (1993) Nucleic acid and classification. *In*: M. Goodfellow & A.G.O'Donnell (ed), *Handbook of new bacterial systematic*. Academic Press Ltd., London. pp. 151-194.

Subramanian V., Rao N. S., Jambunathan R., Murthy D.S. and Reddy B.V.S. (1995) The effect of malting on the extractability of proteins and its relationship to diastatic activity in sorghum. *Journal of Cereal Science* **21**, 283-289.

Sulma, I., Larry, R.S. and Kirleris, A. (1991) Isolation and characterization of microorganisms associated with production of Sudanese *kirsa*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2529-2533.

Sutherland, I.W. (1977) Bacterial exopolysaccharides, their nature and production. *In*: Sutherland, I.W. (Ed.), *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic cell*, p.27.

Svanberg U. and Sandberg A.S. (1989) Improved iron availability in weaning foods using germination and fermentation. *In* D.T.A Southgate, I.T. Johnson & G.R. Fenwick (Eds.) *Nutrient Availability: Chemical and Biological aspects*. UK Cambridge University Press **72**, 179-181.

Songisepp E. (2005) Evaluation of technological and functional properties of the new probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3. PhD Thesis, University of Tartu, Estonia. 114p.

Soufleros E., Barrios M. I. and Bertrand A. (1998) Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**, 226-278.

Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci, M.C. (2003) Isolation and Characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology* **154**, 705-712.

Tanasupawat, S. and Komagata, K. (1995) Lactic acid in fermented foods in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**, 253-256.

Taur A. T., Pawar V. D. and Ingle U.M. (1984) Effect of fermentation on nutritional improvement of grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Indian J. Nutr. Diet.* **21**, 129-136.

Taylor J. R. N.(1992) Mashing with malted grain sorghum. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* **50**, 13-18.

- Taylor J.R.N. and Robbins D.J.(1993). Factors influencing beta-amylase activity in sorghum malt. *J. Inst. Brew.* **99**, 413-416.
- Taylor J.R.N. and Dewar J. (1994) Role of  $\alpha$ -glucosidase in the fermentable sugar composition of sorghum malt mashes. *J. Inst. Brew.* **100**, 417-419.
- Teuber M (1995) The genus *Lactococcus* In: B.J.B Wood and W.H. Holzapfel (ed.) The lactic Acid Bacteria Vol. 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London, UK. pp173-234
- Togo C. A., Feresu S. B., Mutukumira A.N. (2002) Identification of lactic acid bacteria isolated from opaque beer (chibuku) for potential use as a starter culture. *The Journal of Food Technology in Africa* **7**(3), 93-97.
- Towner K. J. and Cockayne A. (1993) Molecular methods for microbial identification and Typing. Chapman & Hall, London UK. 202p.
- Traoré T., Mouquet C., Icard-Vernière C., Traoré A.S. and Trèche S. (2004) Changes in nutrient composition, phytates and cyanide contents and amylase activity during cereal malting in small production units in Ouagadougou (Burkina Faso). *Food Chemistry* **88**, 105-114.
- Trouche G., Vaksmann M., Reynier F.N., Konaté G., Touré A., Weltzien E., Sautier D. and de Raïssac M. (2001) Préservation de l'agrobiodiversité du sorgho in situ au Mali et au Burkina par l'amélioration participative des écotypes locaux. In participatory plant breeding and participatory plant genetic resource enhancement. Proc. Workshop, May 7-10, 2001, Bouaké, Côte d'Ivoire, Sperling L. Ed. IPGR.(<http://www.cirad.fr/colloque/>).
- Ushe, T. C. and Nagy B. (1985) Inhibition of small intestinal colonization of enterotoxigenic *Escherichia coli* by *Streptococcus faecium* M74 in pigs. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* **B181**, 374-382.
- Uvere P.O., Adenuga O.D. and Mordi C.(2000). The effect of germination and kilning on the cyanogenic potential, amylase and alcohol levels of sorghum malts used for burukutu production. *J. Sci of Food and Agric.* **80**, 352-358.
- Uzogara S. G., Agu L. N. and Uzogara E.O. (1990) A review of traditional fermented foods, condiments and beverages in Nigeria: their benefits and possible problems. *Ecol. Food Nutr.* **24**, 267-288.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P. Kersters K and Swings J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* **60**, 407-438.
- van den Berg, D. J. C. , Robijn, G. W. , Janssen, A.C., Giuseppin, M. L. F., Vreeker, R., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Ledebuer, A.M. and Verrips, T. (1995) Production of a novel extracellular polysaccharides by *Lactobacillus sakei* 0-1 and characterization of the polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2840 – 2844.
- van der Aa Kühle A., Jespersen, L., Glover, R.L.K., Diawara, B. and Jakobsen, M. (2001). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer. *Yeasts* **18**, 1069-1079.
- van der Walt J.P. (1956) Kaffircorn malting and brewing studies. II- Studies on the microbiology of Kaffir beer. *J. Sci. Food Agric.* **7**, 105-113.
- Vescovo M., Dellaglio F., Botazzi V. and Sarra P.G. (1979) Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Betabacterium* Orla-Jensen. *Microbiologica* **2**, 317-330.
- Vieira-Dalodé, G., Jespersen, L., Hounhouigan, J., Moller, P.L., Nago, C.M. and Jakobsen, M.(2007). Lactic acid bacteria and yeasts associated with gowé production from sorghum in Bénin. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 342-349.
- Wang Y.D. and Fields M.L. (1978) Germination of corn and sorghum in the home to improve nutritive value. *J. Food Sci.* **43**, 1113- 1115.

Wayne I.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler P., Krichevsky M.I., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E, Starr M.P. and Trüper H.G. (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 463-464.

Weiss N (1992) The Genera *Pediococcus* and *Aerococcus* In A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (Eds.), The prokaryotes. A hand-book on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification and application. Springer-Verlag, New York. pp 1502-1507.

Welsh J. and McClelland, M.(1990) Fingerprinting genomic using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**, 7213-7218.

Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews.* **51**, 221-271.

Wood B.J.B.and Holzapfel W.H.(1995) The Lactic Acid bacteria. Volume 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic & Professional. London.

Yan, T.R. and Lee, C.S. (1997) Characterization of partially purified bacteriocin, Fermentcin B, from *Lactobacillus fermentum*. *Biotechnology Letters* **19** (8), 741-744.

Yao, A.K., Kadio, G., Coulybaly, A. et Agbo, G.Z. (1995) Production du "Tchapalo" à partir du sorgho en Côte d'Ivoire. In: Menyonga, J.M., Bezuneh, T. Nwasike, C.C., Sedogo, P.M. Tenkouano, A.(Eds). Processing and industrial utilization of sorghum and related cereals in Africa. *Proceeding of the OUA/STRC-SAFGRAD regional symposium*. Ouagadougou, Burkina Faso, 22-26 November 1993. pp 55-60.

Zakrzewska-Czerwinska J., Mordaski M., Goodfellow M. (1988) DNA base composition and homology value in the classification of some *Rhodococcus* specis. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2807-2813.

Zvauya, R., Mygochi, T., Parawira, W. (1997) Microbial and biochemical changes occurring during production of *masvusvu* and *mangisi*, traditional Zimbabwean beverages. *Plant Foods for Human Nutrition* **51**, 43-51.

## **ANNEXES**

**Table Va: pH and dominant micro-organism counts during the malting of sorghum grains at two production sites in Tamale.**

Samples/Steps	pH	Lactic acid bacteria (LAB) counts (cfu /g or ml)			Aerobic mesophilic bacteria counts (cfu /g or ml)			Yeast (cfu/g or ml)
		Total LAB	Gram+cat – rods or coccoid rods	Gram+cat – tetrad forming cocci and cocci	Total aerobic mesophilic	Gram–cat+ motile rods	Gram+cat+ rods	
Sorghum grains	nd	$(7.9 \pm 1.4)10^5$	$(5.8 \pm 0.9)10^5$	$(2.1 \pm 0.5)10^5$	$(4.4 \pm 1.1)10^6$	$(4.2 \pm 1.0)10^6$	$(1.3 \pm 0.4)10^5$	$(2.1 \pm 1.5)10^{5*}$
Water used	$5.81 \pm 0.11$	$(4.1 \pm 1.1)10^4$	$(2.4 \pm 0.5)10^4$	$(1.7 \pm 0.6)10^4$	$(2.1 \pm 1.0)10^5$	$(1.7 \pm 1.0)10^5$	$(3.2 \pm 1.4)10^4$	$(2.8 \pm 1.3)10^3$
Water from beginning of steeping	$5.08 \pm 0.22$	$(7.8 \pm 2.5)10^5$	$(4.9 \pm 1.0)10^5$	$(2.9 \pm 1.5)10^5$	$(2.9 \pm 1.1)10^7$	$(2.8 \pm 1.0)10^7$	$(1.4 \pm 0.3)10^6$	$(3.8 \pm 2.2)10^{4*}$
Water from end of steeping	$4.20 \pm 0.50$	$(4.2 \pm 1.7)10^{10}$	$(3.5 \pm 1.5)10^{10}$	$(6.7 \pm 2.2)10^9$	$(4.0 \pm 1.3)10^7$	$(3.5 \pm 1.1)10^7$	$(4.9 \pm 2.3)10^6$	$(5.5 \pm 2.3)10^5$
Soaked grains	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Germinated grains	nd	$(5.0 \pm 1.2)10^7$	$(4.3 \pm 1.0)10^7$	$(6.5 \pm 1.8)10^6$	$(5.3 \pm 2.3)10^6$	$(3.4 \pm 0.7)10^5$	$(4.9 \pm 2.3)10^6$	$(4.8 \pm 1.9)10^{4*}$
Sun dried sorghum malt	$5.42 \pm 0.02$	$(1.3 \pm 0.7)10^7$	$(1.3 \pm 0.7)10^7$	$(3.2 \pm 0.3)10^5$	$(7.1 \pm 1.0)10^6$	$(4.2 \pm 3.1)10^5$	$(6.7 \pm 1.6)10^6$	$(3.5 \pm 0.4)10^{6*}$

\*: presence of moulds; nd: not determined

**Table Vb: pH and dominant micro-organisms counts during malting of sorghum grains at two production sites in Ouagadougou.**

Samples/Steps	pH	Lactic acid bacteria count (LAB) (cfu/g or ml)			Aerobic mesophilic bacteria count (cfu/g or ml)			Yeast count (cfu/g or ml)
		Total LAB	Gram+cat- rods or coccoid rods	Gram+cat- tetrad forming cocci and cocci	Total aerobic mesophilic	Gram-cat+ motile rods	Gram+cat+ rods	
Sorghum grains	5.29± 0.10	(6.9±4.5)10 <sup>5</sup>	(4.3±2.9)10 <sup>5</sup>	(3.1±1.2)10 <sup>5</sup>	(6.7±1.5)10 <sup>6</sup>	(6.4±1.4)10 <sup>6</sup>	(3.3±1.4)10 <sup>5</sup>	(2.1±1.5)10 <sup>5*</sup>
Water used	5.72± 0.41	(6.1±2.6)10 <sup>4</sup>	(1.9±1.0)10 <sup>4</sup>	(4.2±1.6)10 <sup>4</sup>	(2.2±1.0)10 <sup>5</sup>	(2.2±1.0)10 <sup>5</sup>	(1.2±0.5)10 <sup>4</sup>	(1.9±1.0)10 <sup>3</sup>
Water from beginning of steeping	5.30±0.15	(7.0±4.8)10 <sup>5</sup>	(5.1±3.3)10 <sup>5</sup>	(1.8±1.5)10 <sup>5</sup>	(2.0±1.2)10 <sup>6</sup>	(1.4±1.0)10 <sup>6</sup>	(6.0±2.3)10 <sup>5</sup>	(3.8±2.2)10 <sup>5*</sup>
Water from end of steeping	3.90±0.21	(2.9±1.4)10 <sup>10</sup>	(2.5±1.2)10 <sup>10</sup>	(4.3±2.0)10 <sup>9</sup>	(6.4±2.4)10 <sup>7</sup>	(4.1±1.2)10 <sup>6</sup>	(5.9±2.2)10 <sup>7</sup>	(4.6±2.3)10 <sup>5</sup>
Soaked grains	5.33±0.20	(1.6±1.1)10 <sup>8</sup>	(1.3±1.0)10 <sup>8</sup>	(2.3±1.5)10 <sup>7</sup>	(5.6±2.1)10 <sup>7</sup>	(5.3±1.9)10 <sup>7</sup>	(4.0±2.5)10 <sup>6</sup>	(3.3±1.2)10 <sup>5</sup>
Germinated grains	5.22±0.23	(2.6±0.9)10 <sup>7</sup>	(1.9±0.8)10 <sup>7</sup>	(7.2±1.2)10 <sup>6</sup>	(3.8±2.2)10 <sup>6</sup>	(2.9±0.8)10 <sup>5</sup>	(3.5±2.1)10 <sup>6</sup>	(2.7±0.9)10 <sup>4*</sup>
Sun dried sorghum malt	5.30± 0.20	(6.7±1.1)10 <sup>6</sup>	(6.2±1.0)10 <sup>6</sup>	(5.4±1.2)10 <sup>5</sup>	(5.7±3.7)10 <sup>6</sup>	(5.2±3.4)10 <sup>6</sup>	(5.7±3.6)10 <sup>5</sup>	(1.2±0.4)10 <sup>6*</sup>

\*: presence of moulds

**Table XIa: Dominant aerobic mesophilic bacteria count (cfu/g) on PCA media during the brewing of dolo in the production sites of Ouagadougou**

Samples /Steps of production	Samandin			Zone1		
	Gram-Cat+ motile rods	Gram+ Cat+ rods	Gram+ Cat+ cocci	Gram-Cat+ motile rods	Gram+ Cat+ rods	Gram+ Cat+ cocci
1. Sorghum malt flour (SMF)	(2.5±1.5)10 <sup>6</sup>	(1.8±1.1)10 <sup>5</sup>	(1.8±1.1)10 <sup>5</sup>	(6.6±0.3)10 <sup>6</sup>	(7.7±3.5)10 <sup>5</sup>	(1.6±0.7)10 <sup>6</sup>
2. SMF mixed with water or 3..SMF mixed with water and <i>yolga</i> extract	(8.2±5.3)10 <sup>6</sup>	(4.8±3.1)10 <sup>4</sup>	(9.7±6.2)10 <sup>5</sup>	(7.5±6.4)10 <sup>6</sup>	(3.2±2.0)10 <sup>4</sup>	(7.2±6.0)10 <sup>5</sup>
4. Supernatant A (SA)	(2.5±1.0)10 <sup>5</sup>	(1.4±0.6)10 <sup>4</sup>	(2.9±1.2)10 <sup>4</sup>	(1.0±0.7)10 <sup>5</sup>	(2.6±1.7)10 <sup>4</sup>	
5. SA mixed to boiled sediment A **	-	(7.1±6.3)10 <sup>2</sup>	-	-	(2.4±1.9)10 <sup>3</sup>	-
6. Supernatant B (Acidified) ***	-	-	-	-	-	-
7. Acidified middle layer ***	-	(6.1±1.3)10 <sup>5</sup>	-	-	(2.9±0.8)10 <sup>6</sup>	-
8. Sediment B (Acidified) **	-	(3.9±2.5)10 <sup>5</sup>	-	-	(6.0±1.5)10 <sup>5</sup>	-
9. Final wort	-	(3.3±2.7)10 <sup>2</sup>	-	-	(5.0±3.4)10 <sup>2</sup>	-
10. Final product ( <i>dolo</i> )	-	-	-	-	-	(1.1±0.9)10 <sup>5</sup>
<i>Yolga</i> extract	nd	nd	nd	(2.2±0.6)10 <sup>5</sup>	(3.5±1.2)10 <sup>6</sup>	-

- : not found in the isolates; nd: not determined; \*\*: beginning of acidification; \*\*\*: end of acidification

**Table XIb: Dominant aerobic mesophilic bacteria count (cfu/g) on PCA media during the brewing of pito in the two production sites of Tamale**

Samples /Steps of production	Tamale town			Nyankpala		
	Gram-Cat+ motile rods	Gram+ Cat+ rods	Gram+ Cat+ cocci	Gram-Cat+ motile rods	Gram+ Cat+ rods	Gram+ Cat+ cocci
1. Sorghum malt flour (SMF)	(1.9±0.5)10 <sup>7</sup>	(1.6±0.4)10 <sup>6</sup>	(1.4±0.3)10 <sup>5</sup>	(2.3±1.2)10 <sup>7</sup>	(1.7±0.9)10 <sup>6</sup>	(1.4±0.8)10 <sup>5</sup>
2. SMF mixed with water or 3.SMF mixed with water and <i>yolga</i> extract	(2.4±0.4)10 <sup>6</sup>	(1.8±0.4)10 <sup>5</sup>	(3.0±0.6)10 <sup>4</sup>	(4.3±0.5)10 <sup>6</sup>	(3.2±0.3)10 <sup>5</sup>	(5.4±0.6)10 <sup>5</sup>
4. Supernatant A (SA)	(1.8±0.9)10 <sup>6</sup>	(1.2±0.5)10 <sup>5</sup>	(2.1±0.4)10 <sup>4</sup>	(2.7±0.2)10 <sup>6</sup>	(2.1±1.8)10 <sup>5</sup>	(3.4±0.3)10 <sup>4</sup>
5. SA mixed to boiled sediment A **	(3.3±0.8)10 <sup>2</sup>	(2.6±0.2)10 <sup>3</sup>	-	(2.0±0.2)10 <sup>3</sup>	(2.1±1.5)10 <sup>4</sup>	-
6. Supernatant B (Acidified) ***	-	(4.5±1.7)10 <sup>5</sup>	-	-	(6.7±3.1)10 <sup>6</sup>	-
8. Sediment B (Acidified) ***	-	(1.7±0.8)10 <sup>5</sup>	-	-	(9.1±4.0)10 <sup>6</sup>	-
9. Final wort	-	(2.1±1.0)10 <sup>2</sup>	-	-	(3.0±0.7)10 <sup>2</sup>	-
10. Final product ( <i>pito</i> )	-	-	-	-	-	-
<i>Yolga</i> extract	(5.6±0.2)10 <sup>6</sup>	(4.3±0.2)10 <sup>5</sup>	-	(2.8±1.8)10 <sup>5</sup>	(2.1±1.3)10 <sup>4</sup>	-

- : not found in the isolates; nd: not determined; \*\*: beginning of acidification; \*\*\*: end of acidification

**Table XIc: Yeast count (cfu/g) on Malt agar media during the brewing of *dolo* in the production sites of Ouagadougou and Tamale**

Samples /Steps of production	Temperature of the mixtures (°C)	Yeast ( cfu/g)			
		Samandin	Zone1	Tamale town	Nyankpala
1. Sorghum malt flour (SMF)	nd	(2.3±1.0)10 <sup>6*</sup>	(2.6±0.7)10 <sup>6*</sup>	(8.8±1.1)10 <sup>5*</sup>	(2.9±0.6)10 <sup>6*</sup>
2. SMF mixed with water or 3.SMF mixed with water and <i>yolga</i> extract	30-33	(5.3±3.6)10 <sup>5*</sup>	(1.8±1.3)10 <sup>6*</sup>	(5.0±0.8)10 <sup>5*</sup>	(2.5±1.5)10 <sup>5*</sup>
4. Supernatant A (SA)	30-33	(2.7±1.7)10 <sup>5*</sup>	(1.2±0.9)10 <sup>6*</sup>	(2.7±0.4)10 <sup>5*</sup>	(6.9±0.9)10 <sup>5*</sup>
5. SA mixed to boiled sediment A**	59-68	≤10	(7.6±6.6)10 <sup>2</sup>	≤10	(1.0±0.7)10 <sup>3</sup>
6. Supernatant B (Acidified)***	23-25	(1.9±1.2)10 <sup>3</sup>	(2.6±1.5)10 <sup>3</sup>	≤10	(2.7±0.5)10 <sup>4</sup>
7. Acidified middle layer***	24-26	(1.1±1.0)10 <sup>3</sup>	(2.3±0.7)10 <sup>3</sup>	nd	nd
8. Sediment B (Acidified)**	25-28	(2.8±0.6)10 <sup>2</sup>	(1.3±1.0)10 <sup>3</sup>	(1.1±0.4)10 <sup>4</sup>	(7.5±0.6)10 <sup>4</sup>
9. Final wort	28-30	(2.7±2.5)10 <sup>2</sup>	(1.2±0.4)10 <sup>2</sup>	nd	(4.2±0.3)10 <sup>2</sup>
10. Final product ( <i>dolo</i> , <i>pito</i> )	nd	(1.9±2.6)10 <sup>7</sup>	(8.5±6.0)10 <sup>7</sup>	nd	(1.2±0.2)10 <sup>8</sup>
<i>Yolga</i> extract	nd	nd	(5.9±5.4)10 <sup>5</sup>	(2.4±0.4)10 <sup>4</sup>	(1.0±0.6)10 <sup>5</sup>

\*: presence of moulds at the level of 8.5 10<sup>4</sup> to 1.6 10<sup>5</sup>; nd : not determined; \*\*: beginning of acidification; \*\*\*: end of acidification



**Table XIId: pH, titratable acidity and LAB count during the production of *dolo* in the two production sites of Ouagadougou**

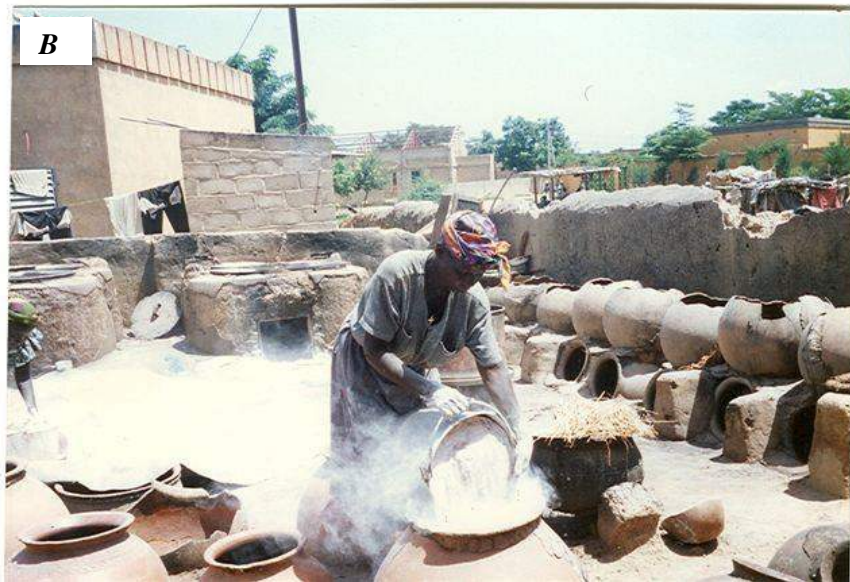
Samples /Steps of production	Zone 1			Samandin		
	pH	Titratable acidity (%)	LAB (cfu/g) Gram+Cat- rods, coccoid rods or tetrad forming cocci	pH	Titratable acidity (%)	LAB (cfug/g) Gram+Cat- rods, coccoid rods or tetrad forming cocci
1. Sorghum malt flour (SMF)	5.47±0.04	0.15±0.02	(1.3±1.1)10 <sup>7</sup>	5.56±0.03	0.13±0.02	(1.7±1.8)10 <sup>7</sup>
2. SMF mixed with water or 3.SMF mixed with water and <i>yolga</i> extract	5.42±0.08	0.16±0.02	(2.9±2.3)10 <sup>6</sup>	5.46±0.04	0.15±0.02	(1.6±1.3)10 <sup>6</sup>
4. Supernatant A (SA)	5.41 ±0.06	0.16±0.01	(3.1±3.9)10 <sup>7</sup>	5.47 ±0.03	0.15±0.01	(5.5±4.9)10 <sup>6</sup>
5. SA mixed to boiled sediment A <sup>**</sup>	5.47±0.02	0.15±0.02	(3.2±2.6)10 <sup>4</sup>	5.49±0.05	0.15±0.02	(4.9±2.8)10 <sup>3</sup>
6. Supernatant B, Acidified <sup>***</sup>	3.72±0.05	0.54±0.02	(2.8±0.8)10 <sup>9</sup>	3.60±0.14	0.57±0.06	(3.3±2.5)10 <sup>8</sup>
7. Acidified middle layer <sup>***</sup>	3.90±0.03	nd	(2.2±2.8)10 <sup>9</sup>	3.56±0.10	nd	(5.3±1.2)10 <sup>8</sup>
8. Sediment B, Acidified <sup>***</sup>	3.87±0.04	nd	(3.5±3.2)10 <sup>9</sup>	3.75±0.04	nd	(2.9±3.2)10 <sup>8</sup>
9. Final wort	3.76±0.08	0.56±0.05	(1.5±1.0)10 <sup>3</sup>	3.61±0.08	0.58±0.04	(1.1±0.8)10 <sup>3</sup>
<i>Yolga</i> extract	5.67±0.04	nd	(1.9±1.6)10 <sup>5</sup>	nd	nd	nd
10. Final product ( <i>dolo</i> )	3.64±0.05	0.60±0.04	(1.6±1.3)10 <sup>6</sup>	3.52±0.06	0.62±0.04	(7.2±6.8)10 <sup>5</sup>

nd: not determined; \*\*: beginning of acidification; \*\*\*: end of acidification

**Table XIe: pH and LAB count during the production of *pito* in the two production sites of Tamale**

Steps of production/ Samples	Tamale town		Nyankpala	
	pH	LAB (cfu/g) Gram+Cat- rods, coccoid rods and tetrad forming cocci	pH	LAB (cfu /g) Gram+Cat- rods, coccoid rods and tetrad forming cocci
1. Sorghum malt flour (SMF)	5.30±0.04	(4.4±3.2)10 <sup>5</sup>	5.48±0.03	(8.7±6.4)10 <sup>5</sup>
2. SMF mixed with water or 3..SMF mixed with water and <i>yolga</i> extract	5.06±0.05	(1.7±0.4)10 <sup>7</sup>	5.16±0.05	(8.1±7.5)10 <sup>5</sup>
4. Supernatant A (SA)	5.32 ±0.02	(1.7±0.2)10 <sup>6</sup>	5.20±0.04	(1.0±0.7)10 <sup>6</sup>
5. SA mixed to boiled sediment A <sup>**</sup>	5.61±0.02	(3.4±1.1)10 <sup>4</sup>	5.46±0.12	(1.2±0.6)10 <sup>5</sup>
6. Supernatant B, Acidified <sup>***</sup>	3.86±0.04	(5.2±0.8)10 <sup>9</sup>	3.56±0.02	(4.9±4.2)10 <sup>9</sup>
8. Sediment B, Acidified <sup>***</sup>	3.64±0.02	(9.0±7.1)10 <sup>8</sup>	3.76±0.03	(9.8±9.4)10 <sup>9</sup>
9. Final wort	3.55±0.02	(1.1±0.8)10 <sup>3</sup>	3.57±0.02	(1.5±1.0)10 <sup>3</sup>
<i>Yolga</i> extract	5.11±0.07	nd	5.10±0.04	(2.1±0.1)10 <sup>5</sup>
10. Final product ( <i>pito</i> )	3.58±0.03	(5.3±1.2)10 <sup>6</sup>	3.46±0.04	(2.9±1.3)10 <sup>6</sup>

nd: not determined; \*\*: beginning of acidification; \*\*\*: end of acidification



**Fig. 27** : Images illustrant l'environnement de production du *dolo* à Ouagadougou (Burkina Faso)  
*A* : Broyage du malt de sorgho. *B*&*C* : Début de l'empâtage ; la farine de malt du sorgho est délayée dans de l'eau puis les impuretés surnageantes sont éliminées.  
*D* : Moût du *dolo* à la fin de l'étape d'acidification



**Fig. 28:** Images illustrant l'environnement de production du *pito* à Tamale (Ghana). A : *Empâtage avec l'extrait aqueux de yolga*  
B : *Filtration*. C : *Cuisson / concentration du moût et refroidissement de moût concentré*

**Table VIII: Pattern of carbohydrate utilization of dominant lactic acid bacteria isolated From malting processing of sorghum grain**

Carbohydrates		<i>Lact. fermentum</i>	<i>Ped acidilactici</i>	<i>W. confusa</i>
1	Glycerol	0	20	0
2	Erythritol	0	0	0
3	D-Arabinose	0	0	0
4	L-Arabinose	100	80	50
5	Ribose	100	80	100
6	D-Xylose	88	0	100
7	L-Xylose	0	0	0
8	Adonitol	0	0	0
9	$\beta$ -Methyl -D- xyloside	0	0	0
10	Galactose	100	100	100
11	D-Glucose	100	100	100
12	D-Fructose	100	100	100
13	D-Mannose	100	100	100
14	L-Sorbose	0	0	0
15	Rhamnose	0	0	0
16	Dulcitol	0	0	0
17	Inositol	0	0	0
18	Mannitol	12	40	0
19	Sorbitol	0	0	0
20	$\alpha$ Methyl-D-mannoside	12	0	0
21	$\alpha$ Methyl-D-glucoside	29	0	0
22	N acetyl glucosamine	47	100	100
23	Amygdalin	47	100	0
24	Arbutin	39	100	50
25	Esculin	47	100	50
26	Salicin	47	100	50
27	Cellobiose	47	100	100
28	Maltose	94	20	100
29	Lactose	70	20	50
30	Melibiose	100	0	100
31	Saccharose	100	20	100
32	Trehalose	41	80	50
33	Inulin	0	0	0
34	Melezitose	0	0	0
35	D-Raffinose	94	0	50
36	Starch	0	0	0
37	Glycogen	0	0	0
38	Xylitol	0	0	0
39	$\beta$ Gentiobiose	47	100	100
40	D-Turanose	0	0	0
41	D-Lyxose	0	0	0
42	D-Tagatose	35	100	0
43	D-Fucose	0	0	0
44	L-Fucose	0	0	0
45	D-Arabitol	0	0	0
46	L-Arabitol	0	0	0
47	Gluconate	100	40	100
48	2 keto gluconate	0	0	0
49	5 keto gluconate	94	0	50

**Table XIV: Pattern of carbohydrate utilization of dominant lactic acid bacteria involved in the brewing *dolo* and *pito***

Carbohydrates		<i>Lact. fermentum</i>	<i>Lact. delbrueckii ssp. delbrueckii (ssp.bulg)*</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
1	Glycerol	0	0	0	0	0
2	Erythritol	0	0	0	0	0
3	D-Arabinose	0	0	0	0	0
4	L-Arabinose	100	0	100	0	0
5	Ribose	100	0	66	0	100
6	D-Xylose	95	0	25	0	0
7	L-Xylose	0	0	0	0	0
8	Adonitol	0	0	0	0	0
9	β-Methyl –D-xyloside	0	0	0	0	0
10	Galactose	85	20 (0)	100	100	100
11	D-Glucose	100	100 (100)	100	100	100
12	D-Fructose	100	100 (100)	100	100	100
13	D-Mannose	85	75 (100)	100	100	100
14	L-Sorbose	0	0	0	0	0
15	Rhamnose	0	0	0	0	0
16	Dulcitol	0	0	0	0	0
17	Inositol	0	0	0	0	0
18	Mannitol	0	0	33	0	0
19	Sorbitol	0	25 (100)	0	0	0
20	α Methyl-D-mannoside	0	0	0	0	0
21	α Methyl-D-glucoside	13	0	0	0	0
22	N acetyl glucosamine	11	100 (100)	100	100	0
23	Amygdalin	13	25 (100)	100	0	0
24	Arbutin	16	75 (100)	100	100	0
25	Esculin	25	100 (100)	100	100	100
26	Salicin	19	75 (100)	100	100	0
27	Cellobiose	25	100 (0)	100	100	0
28	Maltose	95	100 (0)	25	100	100
29	Lactose	55	0 (100)	33	100	100
30	Melibiose	95	0	50	0	0
31	Saccharose	100	100 (100)	33	100	100
32	Trehalose	25	100 (100)	66	0	0
33	Inulin	0	0	0	0	0
34	Melezitose	0	0	0	0	0
35	D-Raffinose	95	50 (100)	25	100	100
36	Starch	0	75 (100)	0	0	0
37	Glycogen	0	0	0	0	0
38	Xylitol	0	0	0	0	0
39	β Gentiobiose	25	75 (100)	100	0	0
40	D-Turanose	5	0	0	0	0
41	D-Lyxose	0	0	0	0	0
42	D-Tagatose	8	25 (100)	100	0	0
43	D-Fucose	0	0	0	0	0
44	L-Fucose	0	0	0	0	0
45	D-Arabitol	0	0	0	0	0
46	L-Arabitol	0	0	0	0	0
47	Gluconate	95	0	33	0	0
48	2 keto gluconate	0	0	0	0	0
49	5 keto gluconate	85	0	0	0	0

\*: in brackets, data for *Lact. delbrueckii ssp. .bulgaricus*

**Tableau XXIII : Liste des souches de *Lact. fermentum* en fonction de leur pouvoir acidifiant**

Groupe G1			Groupe G2		Groupe G3	Groupe G4
ZN10.1 <sup>1</sup>	TPo9	NPW6	<b>ZN6.3</b>	<b>TPo3</b>	ZN2.3	ZN1.8
SF4.5 <sup>2</sup>	TSA12	NSA7	ZN7.9	TSB11	ZN3.3	<b>ZN12.7</b>
SF4.6	<b>TSB4</b>	NPi4	ZN6.2	<b>TPW1</b>	ZN2.4	<b>ZN7.1</b>
SF4.7	<b>TSB1</b>	NSA4	<b>ZN9.10</b>	<b>TPW5</b>	ZN2.7	ZN4.9
SF5.10	<b>TSdB5</b>	NSA1	ZN2.8	<b>TSA9</b>	ZN1.9	ZN3.2
Sd4.3	TPW3	NSS10	ZN6.9	<b>TSA10</b>	ZN1.10	<b>ZN5.3</b>
Sd4.7	TSA11	NPi5	<b>ZN12.5</b>	<b>TSdB4</b>	ZN2.1	ZN6.7
Sd4.8	<b>TSA6</b>	NPo17	ZN12.8	<b>TSdB6</b>	ZN3.4	<b>ZN6.11</b>
SF1.12	TPW1	NY9	ZN2.6	<b>TY10</b>	<b>ZN6.5</b>	<b>ZN5.2</b>
SF6.10	<b>TPo4</b>	NY10	ZN6.6	<b>TY7</b>	ZN6.4	<b>ZN12.1</b>
SF1.10	TSB2	NY5	ZN5.9	<b>TSS14</b>	ZN4.1	NSA10
SF1.7	TSA2	NSS1	ZN2.10	<b>TY3</b>	<b>ZN10.5</b>	
SF1.3	<b>TSdB12</b>	Npo12	ZN4.4	<b>TSA12</b>	<b>ZN10.8</b>	
SF4.11	TSS9	NSS3	<b>ZN7.10</b>	NPo6	<b>ZN4.5</b>	
SF10.7	TPW2	<b>NPo13</b>	ZN9.3	NSA3	ZY8	
SF5.2	TSA3	<b>NSdB11</b>	ZN9.1	<b>NSS3a</b>	<b>ZN1.3</b>	
Sd5.2	TPW10		ZN7.4	<b>NSS11</b>	<b>ZN1.6</b>	
Sd4.2	TPo10		<b>ZN7.6</b>	<b>NPo16</b>	<b>ZN3.4</b>	
SF4.4	TSB10		<b>ZN4.1</b>	<b>NSB11</b>	<b>ZN3.5</b>	
SF1.11	TSA4		<b>Sd6.2</b>	<b>NPi15</b>	<b>ZN3.8</b>	
Sd5.5	<b>TSB7a</b>		SF1.2	<b>NSB1a</b>	<b>ZN4.8</b>	
SF6.6	<b>TSB7</b>		<b>Sd7.4b</b>	NY11	ZN9.4	
SF6.9	TY6		Sd5.1	NSB2	<b>ZN10.9</b>	
SF6.10	TSA13		<b>SD7.17</b>	NSdB7	<b>ZY6</b>	
SF6.4	TPW3		<b>SF4.10</b>	NY12	SF8.2	
<b>SF6.2<sup>5</sup></b>	TSA1		<b>SF12.16</b>	NPi9	<b>SD4.6</b>	
<b>Sd1.8</b>	TPW6		<b>SF12.3</b>	NPi13	<b>TSS12</b>	
<b>SF9.5</b>	TSB6		SF10.12	NSA11	<b>TSS14a</b>	
Sd5.9	<b>TSB13</b>		<b>Sd12.6</b>	NY6	<b>TSB11</b>	
SF7.5	TSB4		<b>Sd12.3</b>	NPi10	<b>TY7a</b>	
SF1.1	NSA6 <sup>4</sup>		Sd10.13	NY2	<b>TPo10a</b>	
Sd5.10a	NSA14		<b>SF6.2a</b>	NSB3	<b>TPo1</b>	
<b>Sd7.6b</b>	NSdB15		SF6.11	NSdB12	<b>NPW12</b>	
<b>Sd7.13</b>	NPi11a		<b>Sf8.5</b>	NPo7	<b>NSB11b</b>	
Sd10.10	NSS5		<b>SF6.1a</b>	NSdB5	<b>NPi15a</b>	
SF9.2	NSB10		<b>Sf4.12</b>	NPi12	<b>NSS6</b>	
SF8.8	NY8		<b>Sf7.15</b>	NSS2		
SF8.1	NY15		<b>Sf8.2</b>	NSB1		
SF7.14	NSA5		<b>SD12.3a</b>	NPi14		
SF7.13	NSS9		<b>SF12.19</b>	<b>NPW7</b>		
SF7.12	NSS15		<b>SD1.3</b>	NPW10		
TPW11 <sup>3</sup>	NSB15		<b>Sf8.5a</b>			

<sup>1</sup> Codes commençant par ZN sont ceux des souches provenant de Zone 1. <sup>2</sup> Codes commençant par S sont ceux des souches provenant de Samandin <sup>3</sup> Codes commençant par T sont ceux des souches provenant de Tamale town. <sup>4</sup> Codes commençant par N sont ceux des souches provenant de Nyankpala <sup>5</sup> En gras : souches ayant une activité antimicrobienne.

**Tableau XXIV: Liste des souches de *Lact. fermentum* ayant des propriétés technologiques intéressantes (pouvoir acidifiant, activité antimicrobienne, capacité à produire des amylases et des polysaccharides exocellulaires)**

Groupe Acidifiant / Codes des souches / Production de polysaccharides exocellulaires (PSE ou EPS) et d'amylase (amy)	Activité antimicrobienne			
	<i>Staph. aureus</i> enterotoxine A	<i>Staph. aureus</i> enterotoxines A +B	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
<b>Groupe G1</b>				
SF6.2 PSE+, amy+	++	+	+	+
<b>SD1.8*</b> PSE+, amy+	++	++	-	-
SF9.5	++	++	+	+
SD7.6b PSE+	+	++	+	-
SD7.13 PSE+	++	+	-	-
TSB4 PSE+	+	-	-	-
TSB1	+	++	+	-
TSdB5	+	+	-	-
TSA6	+	+	+	-
TPo4 PSE+	++	+	-	-
TSdB12	+	-	-	-
TSB7a	+	++	+	-
TSB7 PSE+, amy+	+	+	-	-
TSB13	++	++	-	-
NPo13	++	++	+	-
NSdB11	+++	++	+	+
<b>Groupe G2</b>				
ZN6.3	++	+	-	-
ZN9.10, PSE+	++	+	-	+
ZN12.5	++	+	-	+
ZN7.10	+	+	+	+
ZN7.6	++	+	+	-
<b>ZN4.1*</b>	++	++	+	+
SD6.2 PSE+	++	++	+	-
SD7.4b PSE+	++	++	+	+
SD7.17 PSE+	++	++	+	-
SF4.10 PSE+	++	+	-	+
SF12.16 PSE+	+	+	+	-
SF12.3 PSE+	+	+	+	-
SD12.6 PSE+	+	+	+	-
SD12.3 PSE+	+	+	-	-

PSE+: souches ayant la capacité de produire des polysaccharides exocellulaires

Amy+ : souches ayant une faible activité amylasique

\*: souches sélectionnées et expérimentées comme cultures starter

-: aucune activité

+: activité positive avec des zones d'inhibition 1 à 5 mm de large

++: activité positive avec des zones d'inhibition de 6 à 10 mm de large

+++ : activité positive avec des zones d'inhibition de 11 to 15 mm de large

**Tableau XXIV (suite): Liste des souches de *Lact. fermentum* ayant des propriétés technologiques intéressantes (pouvoir acidifiant, activité antimicrobienne, capacité à produire des amylases et des polysaccharides exocellulaires)**

Groupe Acidifiant / Codes des souches / Production de polysaccharides exocellulaires (PSE ou EPS), production d'amylase (amy)	Activité anti microbienne			
	<i>Staph. aureus</i> enterotoxine A	<i>Staph. aureus</i> enterotoxines A +B	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
<b>Groupe G2</b>				
SF6.2a	+	+	-	-
SF8.5 PSE+	++	++	+	-
SF6.1a* PSE+	+	+	+	+
SF4.12 PSE+	++	+	+	+
SF7.15 PSE+	++	-	-	-
SF8.2*	++	++	+	-
SD12.3a EPS+	+	+	-	-
SF12.19 EPS +	+	+	-	-
SD1.3	++	+	+	+
SF8.5a EPS +	++	++	+	-
TPo3 EPS +, amy+	++	-	-	-
TPW1 EPS +	+++	+++	+	-
TPW5 EPS +	+	++	+	-
TSA9	+	+	+	+
TSA10	+	+	-	+
TSdB4	+	+	+	+
TSdB6	+++	++	+	-
TY10	+++	++	+	-
TY7 EPS +	++	+	+	-
TSS14	++	++	+	+
TY3	++	++	+	+
TSA12 EPS +, amy+	++	-	-	-
NSS3a	+++	+++	+	+
NSS11	+++	+++	+	+
NPo16	+++	+++	+	+
NSB11	++	+	+	+
NPi15	+++	+++	+	+
NSB1a	+++	++	+	-
NPW7	++	++	+	+

EPS+: souches ayant la capacité de produire des polysaccharides exocellulaires

amy+: souches ayant une faible activité amylasique

\*: souches sélectionnées et expérimentées comme cultures starter

-: aucune activité

+: activité positive avec des zones d'inhibition 1 à 5 mm de large

++: activité positive avec des zones d'inhibition de 6 à 10 mm de large

+++ : activité positive avec des zones d'inhibition de 11 to 15 mm de large



**Tableau XXIV (suite) : Liste des souches de *Lact. fermentum* ayant des propriétés technologiques intéressantes (pouvoir acidifiant, activité antimicrobienne, capacité à produire des amylases et des polysaccharides exocellulaires)**

Groupe Acidifiant / Codes des souches / Production de polysaccharides exocellulaire (PSE ou EPS), production d'amylase (amy)	Activité antimicrobienne			
	<i>Staph. aureus</i> enterotoxine A	<i>Staph. aureus</i> enterotoxines A +B	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
<b>Groupe G3</b>				
ZN6.5	+	+	+	-
ZN10.5 EPS +	++	++	-	+
ZN10.8	++	+	+	-
ZN4.5 EPS +, amy+	++	+	+	+
ZN1.3	++	++	-	+
ZN1.6 EPS +	++	++	+	+
ZN3.4 EPS +	++	++	+	+
ZN3.5 EPS +	++	++	+	+
ZN3.8 EPS +	++	++	+	+
ZN4.8	++	+	-	+
ZN10.9	+	+	+	+
ZY6	++	+	+	+
SD4.6	++	++	+	+
TSS12	++	+	+	+
TSS14a	+	+	+	+
TSB11	++	+++	+	+
TY7a	++	+	+	-
TPo10a EPS +	+	-	-	-
TPo1 EPS +, amy+	++	+	+	-
NPW12	++	+++	+	-
NSB11b	+	+	+	-
NPi15a	+++	++	+	+
NSS6	+	+	+	+
<b>Groupe G4</b>				
ZN12.7	++	++	-	-
ZN7.1 EPS +	++	+	-	-
ZN5.3	++	++	-	+
ZN6.11 EPS +	++	+	-	+
ZN5.2 amy+	+	+	-	-
ZN12.1	++	+	+	+

EPS+ : souches ayant la capacité de produire des polysaccharides exocellulaires

amy+ : souches ayant une faible activité amylasique

- : aucune activité

+: activité positive avec des zones d'inhibition 1 à 5 mm de large

++: activité positive avec des zones d'inhibition de 6 à 10 mm de large

+++ : activité positive avec des zones d'inhibition de 11 to 15 mm de large

## **ARTICLES PUBLIES**

## ORIGINAL ARTICLE

# The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort for the production of sorghum beer

H. Sawadogo-Lingani<sup>1</sup>, V. Lei<sup>2</sup>, B. Diawara<sup>1</sup>, D.S. Nielsen<sup>2</sup>, P.L. Møller<sup>2</sup>, A.S. Traoré<sup>3</sup> and M. Jakobsen<sup>2</sup>

1 Département Technologie Alimentaire/IRSAT/CNRST, 03 BP 7047, Ouagadougou, Burkina Faso

2 Department of Food Science Food Microbiology – The Royal and Veterinary Agricultural University, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg, Copenhagen, Denmark

3 Université de Ouagadougou/UFR – SVT/CRSBAN, 03 BP 7131, Burkina Faso

## Keywords

acidification, biodiversity, dolo and pito wort, *Lactobacillus fermentum*, sorghum.

## Correspondence

Hagrétou Sawadogo-Lingani, Chargé de recherche en Biochimie-Microbiologie, Département Technologie Alimentaire (DTA), Institut de Recherche en Sciences Appliquées et Technologies (IRSAT)/Centre National de la Recherche, Scientifique et Technologique (CNRST), Ouagadougou 03 BP 7047, Burkina Faso. E-mail: hagretou@yahoo.fr

2006/0587: received 25 April 2006, revised and accepted 13 November 2006

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03306.x

## Abstract

**Aim:** To quantify and identify the predominant lactic acid bacteria (LAB) in dolo and pito wort processing, and to examine their biodiversity at strain level. **Materials and Results:** The processing of dolo and pito wort was studied at four production sites in Burkina Faso and Ghana. The succession of dominant micro-organisms, pH and titratable acidity were determined from sorghum malt through mashing and acidification to final wort. In the sorghum malt and during mashing, the LAB counts were 5.7–7.5 log CFU g<sup>-1</sup>. Similar levels of yeasts and gram-negative, catalase-positive bacteria were observed. These levels decreased to 3.7–4.5 log CFU g<sup>-1</sup> and ≤2–3 log CFU g<sup>-1</sup>, respectively, at the end of mashing, including a mild heat treatment. During acidification at ambient temperature (30–33°C) lasting for 12–16 h, LAB counts increased to 8.8–9.9 log CFU g<sup>-1</sup>, pH decreased from 5.55 ± 0.12 to 3.72 ± 0.24, and the titratable acidity calculated as lactic acid, increased from 0.13% to 0.61%. The gram-negative, catalase-positive bacteria and yeasts observed in the malt and during mashing were no longer detected. A total of 556 strains of LAB were isolated and purified. The LAB isolates were characterized and identified by a polyphasic approach based on phenotypic and genotypic methods, such as carbohydrate fermentation patterns using API 50 CHL, intergenic transcribed spacers–polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism (ITS-PCR/RFLP), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and 16S rRNA gene sequencing. *Lactobacillus fermentum* was identified as the dominant LAB species in the malt during mashing and during acidification. The other species observed during acidification were *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lact. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Pediococcus acidilactici*. These bacteria comprised a minor fraction of the bacterial population and no distinct microbial succession was observed for the LAB. At species level, the LAB profiles were similar for the four production sites; however, a pronounced diversity was observed at strain level. For one site, which had implemented a cleaning procedure between batches only, *Lact. fermentum* was found.

**Conclusion:** *Lact. fermentum* was found to be the dominant LAB species throughout the entire process to final dolo and pito wort, including the acidification. *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lact. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *P. acidilactici* occurred in low numbers. At strain level, a high diversity based on PFGE–RFLP was observed for *Lact. fermentum* within and between sites.

**Significance and Impact of the Study:** This study for the first time gives details of the involvement of LAB in the production of dolo and pito wort, for West

African traditional sorghum beer production. One species, *Lact. fermentum* was predominant throughout the process, and seems to harbour potential starter cultures to be selected according to technological characteristics determined at strain level.

## Introduction

Dolo and pito are two similar West African traditional fermented beverages produced from sorghum grains [*Sorghum bicolor* (L) Moench, *Sorghum vulgare*]. They are popular drinks, which together with other fermented foods, contribute to the diet of people in West Africa (Odunfa 1985). Pito is common in Ghana, Togo and Nigeria (Ekundayo 1969; Demuyakor and Ohta 1991; Sanni and Lonner 1993); whereas, dolo and similar products, like tchapalo and tchoukoutou, are common in Burkina Faso, Ivory Coast, Mali and Benin (Yao *et al.* 1995; Konlani *et al.* 1996; Kayode *et al.* 2004). In Ghana, the production of pito has important socio-economic implications (Sefa-Dedeh and Asante 1988), and its brewing is traditionally associated with the people in the northern part of the country (Sefa-Dedeh *et al.* 1999), i.e. the frontier region to Burkina Faso. In Burkina Faso, dolo is widely produced throughout the country. It is the most important fermented beverage consumed, and 40% of sorghum grains produced in Burkina Faso is used for its production (Journe 1997). The production of dolo and pito is an old family tradition performed by women, and remains an important activity for them. The traditional brewing of dolo according to the Mossi process in Ouagadougou, central region of Burkina Faso, and of pito according to the Dagarti process in Tamale, Northern Region of Ghana, are complex as seen from Fig. 1. The entire process lasts 2 days and involves the main steps, such as milling of malted sorghum, mashing, acidification, cooking, cooling and finally the alcohol fermentation of the wort by local dried yeast [*Saccharomyces cerevisiae* (van der Aa Kühle *et al.* 2001; Glover *et al.* 2005)] taken from a previous fermentation. The bark of yolga (*Grewia bicolor*, Juss) is used to favour decanting, and clarification of the wort. Previous investigations concerning the microbiology of dolo and pito, dealt primarily with the alcohol fermentation and characterization of yeasts involved (Sefa-Dedeh and Asante 1988; Demuyakor and Ohta 1991; Konlani *et al.* 1996; Sefa-Dedeh *et al.* 1999; van der Aa Kühle *et al.* 2001; Glover *et al.* 2005). Microbiological investigation of the alcoholic fermentation is not included in the present study. Several investigations have shown the involvement of lactic acid bacteria (LAB) in African traditional fermented cereal-based foods and beverages, including *Lactobacillus*, *Leuco-*

*nostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* and *Weissella* species (Odunfa and Adeyele 1985; Gashe 1985; Halm *et al.* 1993; Hounhouigan *et al.* 1993a; Johansson *et al.* 1995; Hamad *et al.* 1997; Olasupo *et al.* 1997; Gasseem 1999; Hayford *et al.* 1999; Lei and Jakobsen 2004). However, to our knowledge, no investigation has dealt in detail with the involvement of LAB in the acidification of dolo and pito wort. This study aimed at obtaining detailed information of the LAB involved in dolo and pito production.

## Materials and methods

### Production sites investigated

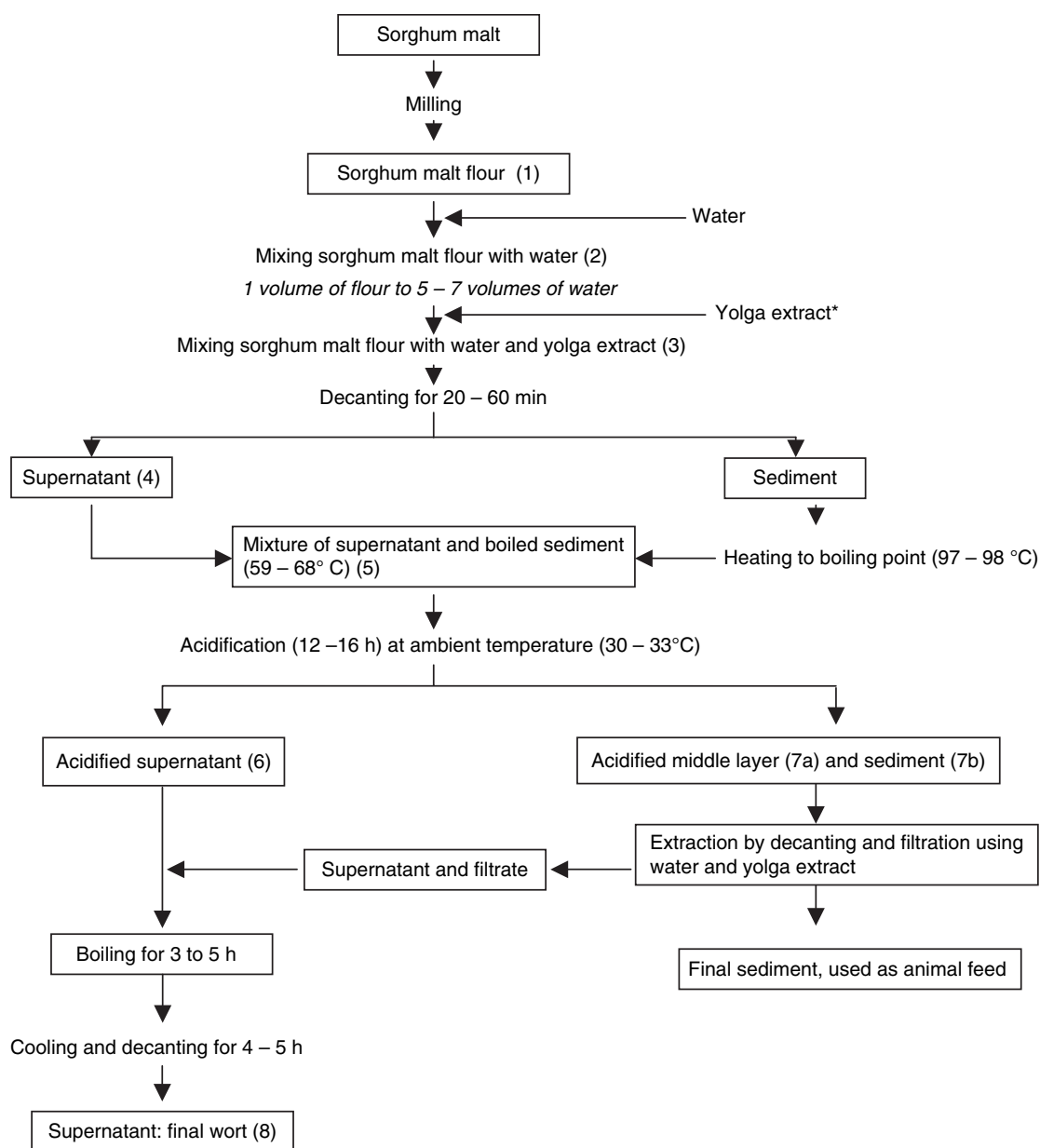
The traditional brewing processes of dolo and pito were investigated at two production sites in Ouagadougou, Burkina Faso, and two production sites in Tamale, Northern Ghana, respectively. The processing of dolo was carried out by two Mossi's women in Samandin and Zone1 areas of Ouagadougou. The processing of pito was carried out by two Dagarti's women in Tamale town and Nyankpala village. The production sites were named by the areas where the productions were carried out: Samandin, Zone1, Tamale town and Nyankpala. Samandin production site is distinguishable from the others by a hygienic practice, including cleaning of calabashes, pots and utensils used with soap and local potash solution, after each batch.

### Sampling

Sampling was done twice at each of the four sites on two separate occasions. For each sampling, duplicate samples (200 g or 200 ml) were taken in sterile screw-cap bottles at steps 1–8 shown in Fig. 1. Yolga extract used in the process and the final products pito and dolo were also sampled. The samples were kept in an icebox and taken to the laboratory for analyses within a few hours.

### Chemical analysis

The pH was measured with a pH meter (Model HI 8520; Hanna Instrument, Singapore). For solid samples, 10 g were mixed with 20 ml of distilled water prior to pH measurement. For liquid sample, the pH was measured



\*: the aqueous extract of yolga (*Grewia bicolor*, Juss) bark is used to favor the decanting.

**Figure 1** General flow diagram of traditional production of dolo and pito wort in four production sites at Ouagadougou and Tamale; the bold numbers in brackets indicate the sampling steps. Sample 1: sorghum malt flour; samples 2–5: mashing; samples 6–7: acidification; sample 8: final wort.

directly. For titratable acidity determination, 20 ml of liquid sample or suspension prepared as earlier was centrifuged for 5 min at 3500 g. Of the supernatant, 10 ml was transferred to a 50-ml measuring flask and filled up to 50 ml with distilled water. After mixing, 10 ml of the diluted sample was titrated with 0.1-mol l<sup>-1</sup> NaOH using 1% phenolphthalein as indicator. The titratable acidity (as g lactic acid per 100 ml or g of sample) was calculated according to Amoah-Awua *et al.* (1996).

### Microbiological analyses

Analyses were carried out at the Département Technologie Alimentaire (DTA)/IRSAT/CNRST in Ouagadougou (Burkina Faso) and at the University of Development Study (UDS)/DANIDA laboratory, Tamale (Ghana). For each sample analysed at DTA microbiology laboratory, 10 g were added to 90 ml of sterile diluent (0.1% peptone, 0.85% NaCl, pH 7.0 ± 0.2) and homogenized in a

stomacher (Lab Blender, Model 400; Seward Medical, London, UK) for 30 s at normal speed. For the analyses at UDS/DANIDA laboratory, 1 g of sample was added to 9 ml of sterile diluent and homogenized by vortex mixing. From appropriate tenfold dilutions, CFU was determined by using the pour plate method. For aerobic mesophilic bacteria, plate count agar (PCA, Merck) was incubated at 37°C for 48 h. LAB were enumerated using de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS, Oxoid), incubated under anaerobic conditions (Anaerocult A, Merck) at 37°C for 72 h. Yeast were enumerated on malt agar (MA, Difco) containing per litre, 100-mg chloramphenicol and 50-mg chlortetracycline incubated at 30°C for 72 h.

#### Isolation, purification and preliminary phenotypic characterization of LAB

For each sample, 10–20 colonies grown on MRS plates of the highest dilution were taken at random and purified by streaking onto MRS agar. Pure cultures were characterized according to colony and cell morphology, gram reaction (Gregersen 1978), catalase reaction (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and gas production by using the semi-solid medium of Gibson and Abd-el-Malek (Guiraud 1998). Isolates tentatively identified as LAB were stored at –20°C in MRS broth with 50% (w/w) glycerol.

#### Identification of LAB

A polyphasic taxonomic approach was used for the identification of the LAB isolates, which was carried out at the Department of Food Science, Food Microbiology, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark. The isolates were cultured on MRS agar for 48 h, and then in MRS broth at 37°C for 24 h before using. A total of 350 isolates covering steps 1–8 (Fig. 1), yoga extract and final products were initially grouped by intergenic transcribed spacers–polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism (ITS-PCR/RFLP). A total of 59 isolates were selected from ITS-PCR/RFLP groups, which were tentatively identified by using API 50 CHL strips and APILAB Plus version 3.3.3 (BioMerieux), the growth in MRS broth at 10°C and 45°C, the growth in MRS broth at pH 9.2 and in MRS broth with 6.5% NaCl, and their identities confirmed by sequencing of the 16S rRNA gene. To investigate the diversity at strain level, PFGE, as described later, was used to characterize 151 isolates corresponding to all the isolates from one production site of Ouagadougou, Burkina Faso (Zone1) and one production site of Tamale, Ghana (Nyankpala).

#### ITS-PCR/RFLP analysis of LAB isolates

The 16S-ITS-23S rRNA gene region was amplified using forward primer Cy5-16S 1500F (5'-AAG TCG TAA CAA GGT A-3') and reverse primer 23S-32R (5'-GCC ARG GCA TGG ACC-3') (DNA Technology, Aarhus, Denmark), according to the protocol described by Lei and Jakobsen (2004). The PCR products were digested (65°C, 16 h) using Taq<sup>I</sup> (BioLabs, New England, USA) as restriction endonuclease. The ITS-PCR fragments and RFLP products were separated by electrophoresis (100 V, 1 h) on 2% agarose gel using a DNA molecular marker (GeneRuler DNA ladder mix, Fermentas, Vilnius, Lithuania) as a standard for the calculation of the fragment sizes. The gels of ITS-PCR/RFLP products were visualized under UV transillumination and photographed. The separated ITS-PCR/RFLP fragments were analysed using Kodak ID Image Analysis software version 3.5 (VWR International Kodak ApS, Albertslund, Denmark).

#### Carbohydrate fermentation of the LAB isolates

The profile of carbohydrate fermentation was carried out by API 50 CHL strips (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) and was performed according to the instructions of the manufacturer; the isolates were tentatively identified using APILAB Plus version 3.3.3 (BioMerieux).

#### Identification by 16S rRNA gene sequencing

Sequencing was performed according to the method, reagents and equipments described by Lei and Jakobsen (2004). The template DNA was extracted and amplified using forward primer U968gc (5'-GAA CGC GAA CCT TAC-3') and reverse L1401 (5'-GCG TGT GTA CAA GAC CCC-3') (DNA Technology, Aarhus, Denmark). The amplification of purified DNA for sequencing was carried out with forward primer 970 F (5'-GGA CGC GAA CCT TAC-3') and reverse primer 1372 R (5'-CAG GCC CGG GAA CGT ATT CAC-3') (DNA Technology, Aarhus, Denmark). The sequence of rRNA gene and the identities of isolates were obtained by BLAST Gen database (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>). The DNA extraction method described by Lei and Jakobsen (2004) was not efficacious for the isolates presumptively identified as *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*. The following procedure was used for them: 1.5 ml of overnight culture in MRS broth was centrifuged at 8000 g for 10 min. The pellet was incubated for 16 h at 37°C in 1 ml of lysozym/mutanolysin dilution [50-mmol l<sup>-1</sup> EDTA pH 8.5, 0.05% *N*-l-lyl-sarcasin containing 2 mg ml<sup>-1</sup> of lysozym (Sigma, Aldrich, Germany) and 3 U ml<sup>-1</sup> mutanolysin (Sigma)]. The mixture was centrifuged and the supernatant removed. The pellet was incubated for 16 h at 53°C in 0.5 ml of proteinase K solution [10-mmol l<sup>-1</sup> tris, 0.5-mol l<sup>-1</sup> EDTA pH 8.5, 1% sodium doceyl sulfate (SDS), 2-mg ml<sup>-1</sup>

proteinase K (USB Cleveland United Kingdom)]. This solution was used as DNA template for the sequencing.

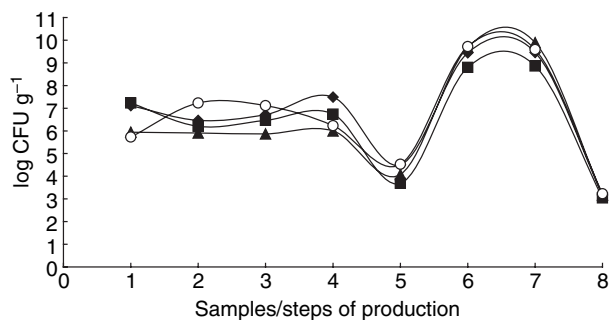
#### PFGE of LAB isolates

From a pure culture in MRS broth (16 h, 37°C), 0.6 ml was centrifuged at 14 000 *g* for 2 min at 4°C. The cells were washed with 1 ml of sodium-chloride-EDTA (SE) buffer (75-mmol l<sup>-1</sup> NaCl, 25 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, pH 7.4), and resuspended in 0.6 ml of SE buffer. A volume of 0.1 ml was used to measure the OD<sub>600</sub>. The remaining 0.5 ml was centrifuged and the pellet resuspended in a volume of SE buffer (in ml) equivalent to the numerical value of the OD<sub>600</sub>. Agarose blocks were made by mixing cell suspension with an equal volume of 2% agarose (Seakem GTG FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) in SE buffer and transferring to a plug mould. The blocks were incubated for 16 h at 37°C in 0.5 ml of lysozym/mutanolysin dilution [50-mmol l<sup>-1</sup>EDTA pH 8.5, 0.05% *N*-loryl-sarcasin dilution containing 2 mg ml<sup>-1</sup> of lysozyme (Sigma, Aldrich, Germany) and 3-U ml<sup>-1</sup> mutanolysin (Sigma)]. Subsequently, the blocks were incubated for 16 h at 53°C in 0.5-ml proteinase K solution [10-mmol l<sup>-1</sup>tris, 0.5 mol l<sup>-1</sup>EDTA pH 8.5, 1% sodium dodesyl sulfate (SDS), 2-mg ml<sup>-1</sup> proteinase K (USB, Cleveland, United Kingdom)]. The proteinase K solution was removed and the blocks were washed five times with 1.5 ml of EDTA (50 mmol l<sup>-1</sup> pH 8.5) for 30 min. One third of a block was cut and incubated for 30 min at room temperature in 0.1 ml NE buffer 4 (10×) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) containing 100-mg ml<sup>-1</sup> bovine serum albumin (BSA). DNA was digested overnight at 25°C with 12 U of restriction enzyme *Apa* I (New England Biolabs) or 10-U *Asc* I (New England Biolabs) in 0.1 ml of NE buffer 4 (10×) containing 100-mg ml<sup>-1</sup> BSA. Electrophoresis was run at 14°C on 1% agarose (Seakem GTG BioWhittaka BMA, Rockland, ME, USA) for *Apa* I, and on 1.1% agarose for *Asc* I in 0.5× tris-borate-EDTA (TBE) (10× TBE buffer is 0.89-mol l<sup>-1</sup> tris-base, 0.89-mol l<sup>-1</sup> boric acid and 20-mmol l<sup>-1</sup> EDTA, pH 8.0) using CHEF-DRII (BioRad, Hercules, USA). The running conditions were: 17 h at 200 V with pulse time from 1 to 15 s for *Apa* I, and 24 h at 175 V with pulse time from 2 to 30 s for *Asc* I. A DNA size marker (Low Range PFGE Marker 350; New England Biolabs) was added at both sides of the gel. The gel was stained with ethidium bromide (2 mg ml<sup>-1</sup>) for 1 h, washed with distilled water for 2 h and visualized under UV light and photographed. Cluster analysis of the PFGE patterns was performed using BioNumerics 2.50 (Applied Maths, Sint-Martens-Latam, Belgium). The dendrograms were calculated on the basis of Dice's coefficient of similarity, using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages clustering algorithm (UPGMA).

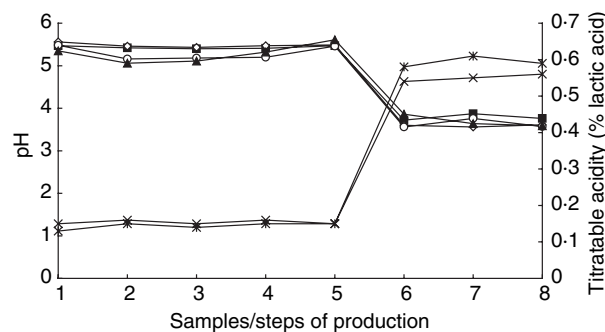
## Results

### LAB counts, pH and titratable acidity during production of dolo and pito wort

LAB counts during the production of dolo and pito wort are shown in Fig. 2. As seen from Fig. 2 and with reference to the various processing steps shown in Fig. 1, LAB counts in the sorghum malt flour (step 1) and during the mashing (steps 2–4) at the four production sites were in the range of 5.7–7.5 log CFU g<sup>-1</sup>. The same levels of gram-negative, catalase-positive bacteria and yeasts were observed in these samples (results not shown). At step 5, when the sediment was boiled and mixed with the unboiled supernatant, LAB counts decreased to 3.7–4.5 log CFU g<sup>-1</sup>. At that step, gram-negative bacteria and yeasts were very often not detected (results not shown). The variations of pH and titratable acidity during the production of the wort are shown in Fig. 3. pH and titratable acidity remained relatively constant from the sorghum



**Figure 2** Lactic acid bacteria counts during production of dolo wort at Zone 1 (ZN) and Samandin (S), and pito wort at Nyankpala (N) and Tamale town (Tt); for the explanation of steps 1 to 8, see Fig. 1. ◆, ZN; ■, S; ▲, N; and ○, Tt.



**Figure 3** pH and titratable acidity (TA) during production of dolo wort at Zone 1 (ZN) and Samandin (S), and pito wort at Nyankpala (N) and Tamale town (Tt). For explanation of steps 1 to 8, see Fig. 1. ■, ZN pH; ◇, S pH; ○, N pH; ▲, Tt pH; ×, ZN TA; and ⋈ STA.

malt to step 5. During the acidification (steps 6 and 7), LAB counts increased to 8.8–9.9 log CFU g<sup>-1</sup> (Fig. 2), while the pH decreased from 5.46–5.61 to 3.56–3.90 and the titratable acidity, as lactic acid, increased from 0.13 to 0.61% (Fig. 3). No yeast and gram-negative bacteria were detected (results not shown). After boiling and cooling to ambient temperature, the final wort had a low number of LAB in the range of 2–3 log CFU ml<sup>-1</sup> and a pH of 3.57–3.76. After the addition of dried yeast and an alcoholic fermentation lasting for 9–12 h, the pH of the final dolo and pito decreased lightly to 3.46–3.64. The ready-to-drink products (dolo, pito) contained LAB and yeasts at the level of 5–6 log CFU ml<sup>-1</sup> and 7–8 log CFU ml<sup>-1</sup>, respectively (result not shown).

### Identification of predominant LAB

A total number of 556 gram-positive, catalase-negative, nonsporing and nonmotile rods, coccoid rods, cocci or tetrad-forming cocci, were isolated from dolo and pito wort production. The majority, 91% and 89% in dolo and pito, respectively, were heterofermentative LAB. Considering all the steps of the process (Fig. 1), 350 isolates comprising 179 from dolo processing and 171 from pito processing, were characterized by ITS-PCR/RFLP analysis.

According to their ITS-PCR profiles, 94.9% of the isolates were distributed in seven groups named A, B, C, D, E, F and H (Table 1). Of the remaining isolates, 2.3% were characterized by the absence of band and were named group G, and 2.8% showed profiles different from A to H and were referred to group O. The group A isolates were characterized by a profile of five bands with sizes of 773, 549, 486, 409 and 290 pb. The profiles B, C,

D, E and F were characterized by the presence of two or more of the same bands as group A, plus one additional band. Group H presented a profile with three bands of 488, 420 and 296 pb. The dominant ITS-PCR profiles of the predominant LAB involved in the production of dolo and pito wort were groups D (32.6% of the isolates), A (26% of the isolates) and C (22.6% of the isolates). The profiles A and D were observed almost at the same levels among the isolates from dolo and pito processes. The profile C was observed mainly for the isolates from the dolo process, while profile B was mainly observed among the isolates from pito process, and profile E was only observed for a few isolates from pito process. After digestion with the restriction endonuclease *Taq*<sup>2</sup>I, the isolates belonging to the groups A, B, C, D, E and F clustered mainly in four groups (a, b, c, d) according to the number of fragments generated for sizes lower than 400 bp (389, 332, 203, 135 and 90 bp) (Table 1). Most of the isolates belonging to the ITS-PCR group A, gave the ITS-PCR/RFLP profile a, but a few isolates gave the profiles b or c (Table 1). Likewise, the isolates clustering in the ITS-PCR group B gave the ITS-PCR/RFLP profile b for most of them, and some gave the profiles a or c (Table 1).

A total of 59 isolates were selected from the different ITS-PCR/RFLP groups to cover all steps of processing (Table 2) for partial sequence analysis of the 16S rRNA gene (region 968–1401). The sequence of each of the isolates was used to search the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database. As seen from Table 2, a total of 56 isolates were identified, and all the LAB isolated from sorghum malt to the final wort belonging to the ITS-PCR groups A, B, C, D, E and F were related to *Lact. fermentum* with 97–99% similarity; all of

**Table 1** ITS-PCR/RFLP products from 350 strains of LAB isolated from two production sites of dolo (Ouagadougou, Burkina Faso) and two production sites of pito (Tamale, Ghana).

ITS-PCR products		RFLP products		% of isolates		
Profiles	Sizes of fragments (bp)	Profiles	Sizes of fragments (pb)	Total	Dolo process	Pito process
A	773 ± 24; 549 ± 17; 486 ± 13; 409 ± 14; 290 ± 8	a <sup>1</sup> (b, c)	389 ± 11; 332 ± 9; 203 ± 13; 135 ± 10; 90 ± 7	26	13.14	12.85
B	773 ± 24; 486 ± 13; 409 ± 14; 290 ± 8	b <sup>1</sup> (a, c)	551 ± 16; 389 ± 11; 332 ± 9; 203 ± 13; 135 ± 10; 90 ± 7	6.8	1.10	5.71
C	549 ± 17; 486 ± 13; 409 ± 14; 290 ± 8	c	332 ± 9; 203 ± 13; 135 ± 10; 90 ± 7	22.6	19.14	3.43
D	486 ± 13; 409 ± 14; 290 ± 8	d	203 ± 13; 135 ± 10; 90 ± 7	32.6	13.43	19.14
E	773 ± 24; 549 ± 17; 486 ± 13; 409 ± 14; 290 ± 8; 209 ± 8	a	389 ± 11; 332 ± 9; 203 ± 13; 135 ± 10; 90 ± 7	2	0	2
		b	551 ± 16; 389 ± 11; 332 ± 9; 203 ± 13; 135 ± 10; 90 ± 7			
F	773 ± 24; 486 ± 13; 409 ± 14; 290 ± 8; 209 ± 8	d	203 ± 13; 135 ± 10; 90 ± 7	2	0.30	1.71
H	488 ± 19; 420 ± 14; 296 ± 16	h	343 ± 29; 280 ± 36; 200 ± 17	2.9	1.43	1.43

<sup>1</sup>: Most of the strains gave the profile indicated but some of them gave the profile in brackets.



**Table 2** Identification of lactic acid bacteria isolates involved in the production of dolo and pito wort at two production sites in Ouagadougou and two production sites in Tamale, by 16S rRNA gene sequencing.

Steps of production/samples	Number of LAB isolates	ITS-PCR profiles										16S rRNA gene sequencing	
		A	B	C	D	E	F	G	H	O	Identification	Similarity (%)	
Step1 <sup>1</sup> Sorghum malt flour (SMF)	42	19	3	11	3	1	-	-	5	-	A <sup>2</sup> : <i>Lact. fermentum</i>	98	
											A: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											B: <i>Lact. fermentum</i>	97	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	97	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	99	
Step2 <sup>1</sup> and step 3 <sup>1</sup> SMF mixed with water & SMF mixed with water and yolga extract	37	18	3	3	9	-	-	-	2	2	H: <i>Pediococcus acidilactici</i>	98	
											A: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											H: <i>Ped. acidilactici</i>	98	
Step4 <sup>1</sup> Supernatant	51	11	8	11	15	2	4	-	-	-	O: <i>Leuconostoc lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	95	
											O: <i>Acetobacter pomorum</i>	98	
											A: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											B: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	99	
Step5 <sup>1</sup> Supernatant mixed to boiled sediment	36	11	3	2	15	1	-	2	-	2	D: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											A: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											A: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											B: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											B: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											E: <i>Lact. fermentum</i>	97	
Step6 <sup>1</sup> Acidified supernatant	64	22	5	17	14	3	-	3	-	-	O: unidentified	-	
											O: <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	98	
											A <sup>2</sup> : <i>Lact. fermentum</i>	99	
											A: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											A: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											B: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	99	
Step7 <sup>1</sup> Acidified middle layer and sediment	66	9	1	18	28	-	1	2	3	4	C: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											A: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											F: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											G: <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	97	
											H: <i>Ped. acidilactici</i>	98	
									H: <i>Ped. acidilactici</i>	98			

**Table 2.** (Continued).

Steps of production/samples	Number of LAB isolates	ITS-PCR profiles										16S rRNA gene sequencing	
		A	B	C	D	E	F	G	H	O	Identification	Similarity (%)	
Yolga extract	21	–	2	3	13	1	–	–	–	2	O: <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	98	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	99	
											O: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	93	
Dolo, pito	33	–	1	14	17	–	–	–	–	1	O: unidentified	–	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											C: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											D: <i>Lact. fermentum</i>	98	
											O: unidentified	–	

<sup>1</sup>: see Fig. 1 for explanations. <sup>2</sup>: the letters indicate the ITS-PCR profile of the strain randomly taken for the 16S rRNA gene sequencing.

them were rod-shaped, producing gas from glucose. The LAB belonging to the group G were related to *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* with 97–98% similarity and the group H isolates, tetrad-forming cocci, not producing gas from glucose, were identified as *Ped. acidilactici* with 98% similarity. The remaining LAB isolates referring to group O were related to *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Leuconostoc lactis* with a low percentage of similarity of 93% and 95%, respectively, *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* with 98% similarity, *Lact. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with 98% similarity, or unidentified (Table 2). The isolates identified as *Lact. delbrueckii* were rod shaped, not producing gas from glucose; in addition, all of them related to the subspecies *delbrueckii* were not able to ferment lactose, while the isolate corresponding to the subspecies *bulgaricus* is capable of fermenting lactose. The two isolates related to *L. lactis* ssp. *lactis* and *Leuc. lactis* were coccoid rod-shaped cells in pairs and chains. *Leuconostoc lactis* isolate produced gas from glucose, while *L. lactis* ssp. *lactis* isolate did not, and was able to grow at 10°C but not at 45°C; was capable of growing in MRS broth at pH 9.2, but not in MRS broth with 6.5% NaCl. In spite of the low percentage of 16S rRNA gene sequence similarity, the attribution of the species *L. lactis* ssp. *lactis* and *Leuc. lactis* was decided on the basis of polyphasic approach by using phenotypic data.

#### Carbohydrate fermentation patterns of the LAB isolates

The investigation on the sugar fermentation patterns showed that all the isolates of *Lact. fermentum*, *Lact. delbrueckii*, *Ped. acidilactici*, *Leuc. lactis* and *L. lactis* were able to ferment D-glucose and D-fructose. In addition to these sugars, all the isolates of *Lact. fermentum* were able to ferment L-arabinose, ribose and saccharose but did not ferment starch; 95% of them were capable of fermenting

D-xylose, maltose, melibiose, D-raffinose and gluconate; 85% were able to ferment galactose, D-mannose and 5 keto gluconate; lactose was fermented by 55% of the isolates, while 25% were capable of fermenting esculin, cellobiose, trehalose and  $\beta$  gentiobiose; amygdalin was fermented by 13% of the isolates. The isolates identified as *Lact. delbrueckii* did not ferment pentoses and gluconate; all of the isolates related to *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* were able to ferment maltose, esculin, cellobiose, saccharose and trehalose but did not ferment lactose; 75% of them were able to ferment D-mannose, starch and  $\beta$  gentiobiose; D-raffinose was fermented by 50% of the isolates, while 25% were capable of fermenting amygdalin and D-tagatose. However, the isolate related to *Lact. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* compared with the previous subspecies, was able to ferment lactose but did not ferment maltose and cellobiose. All the isolates identified as *Ped. acidilactici* were capable for fermenting L-arabinose, galactose, D-mannose, amygdalin, esculin, cellobiose,  $\beta$ -gentiobiose and D-tagatose, but did not ferment starch; ribose and trehalose were fermented by 66%, and 33% of the isolates were able to ferment mannitol, lactose and saccharose. The isolate related to *L. lactis* ssp. *lactis* was capable of fermenting galactose, D-mannose, esculin, maltose, lactose, saccharose, ribose and raffinose, while the one related to *Leuc. lactis*, in addition to these sugars except ribose, was able to ferment cellobiose.

#### Distribution of dominant LAB species between production steps and production sites

The distribution of LAB species at the different steps of the four production sites (Table 3) shows clearly that *Lact. fermentum* is the dominant species associated with the different stages of the production of dolo and pito

**Table 3** Distribution (in %) of lactic acid bacteria species during the production of dolo and pito by steps and production site

Step of production / Samples	Dolo production sites (Ouagadougou)						Pito production sites (Tamale)					
	Zone 1					Samandin	Nyankpala			Tamale town		
	<i>Lact. ferm</i>	<i>Lact. delb</i>	<i>Ped. acid</i>	<i>Leuc. lactis</i>	<i>L. lactis</i>	<i>Lact. ferm</i>	<i>Lact. ferm</i>	<i>Lact. delb</i>	<i>Ped. acid</i>	<i>Lact. ferm</i>	<i>Lact. delb</i>	<i>Ped. acid</i>
Step 1. Sorghum malt flour (SMF)	90	– <sup>1</sup>	10	–	–	100	85.7	–	14.3	77.7	–	22.2
Step 2. SMF mixed with water	80	–	10	10	–	nd <sup>2</sup>	nd	–	–	nd	–	–
Step 3. SMF mixed with water and yolga extract	85.7	–	14.3	–	–	nd	89	–	–	100	–	–
Step 4. Supernatant	100	–	–	–	–	100	100	–	–	100	–	–
Step 5. Supernatant mixed to boiled sediment	75	12.5	–	–	–	100	88.2	11.7	–	100	–	–
Step 6. Acidified supernatant	90	10	–	–	–	100	94.1	5.9	–	90.9	9.1	–
	95	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Step 7a. Acidified middle layer	85.7	14.3	–	–	–	100	nd	–	–	nd	–	–
Step 7b. Acidified sediment	60	26.6	13.3	–	–	100	87.5	6.2	6.2	80	20	–
Yolga extract	75	–	–	–	25	nd	87.5	–	–	100	–	–
Final products: dolo, pito	100	–	–	–	–	100	87.5	–	–	100	–	–

*Lact. ferm*: *Lactobacillus fermentum*; *Lact. delb*: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*; *Ped. acid*: *Pediococcus acidilactici*; *Leuc. lactis*: *Leuconostoc lactis*; *L. lactis*: *Lactococcus lactis*; <sup>1</sup> –: not found in the isolates; <sup>2</sup> nd: not determined.

wort. This species was predominant from sorghum malt flour (77–100%), during the mashing (80–100%), at the beginning of acidification (75–100%) and the end of acidification (60–100%), even in the yolga extract (75%) and in the final products, dolo and pito (87–100%). In the middle layer and the sediment, *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* and *Ped. acidilactici* were often observed. *Leuconostoc lactis* was identified at Zone1 production site and *L. lactis* ssp. *lactis* was identified from the yolga extract. Those two species were not involved in the acidification of the wort. At the Samandin production site, all the predominant isolates were identified as *Lact. fermentum*.

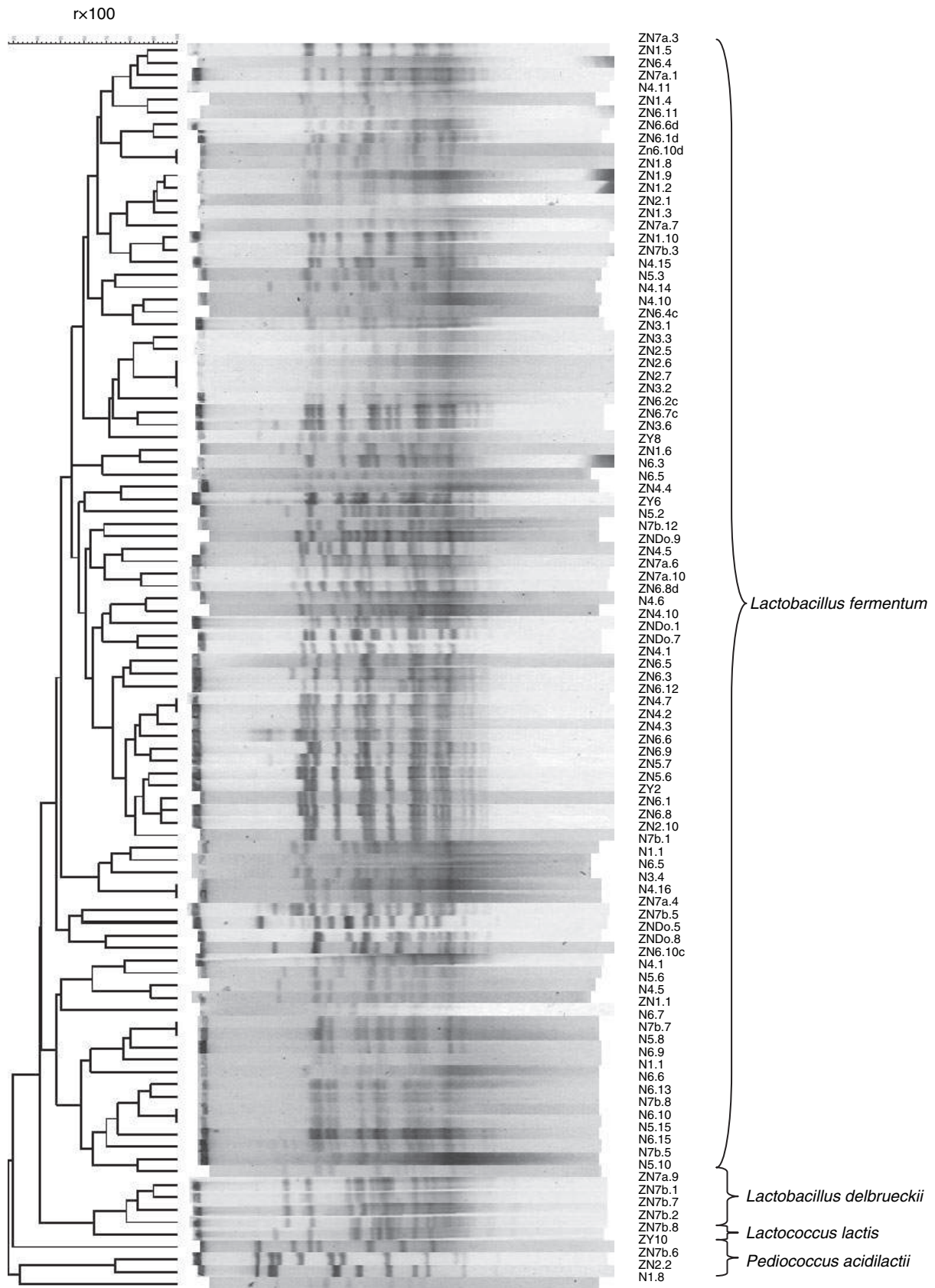
### Biodiversity of LAB isolates

PFGE analysis was used for typing at strain level, all LAB isolates from Zone1 production site (Ouagadougou, Burkina Faso) and all isolates from Nyankpala production site (Tamale, Ghana). Digestion with restriction enzyme *Apa* I generated profiles with more than 20 fragments of sizes  $\leq 23.1$  kb and showed that the most of the strains were different from each other (result not shown). Digestion with *Asc* I-generated profiles containing 8–15 fragments also showing a pronounced diversity among the strains. Figure 4 shows the UPGMA dendrogram obtained from the cluster analysis of the PFGE *Asc* I patterns of 104 isolates from Zone1 production site (strain codes beginning with ZN) and Nyankpala production site (strain codes beginning with N). Within the species, as seen from Fig. 4, the *Lact. fermentum* isolates clustered in several different groups with different fingerprint patterns corresponding to different strains. In most cases, the iso-

lates clustered together according to the production site, but systematic clustering was not observed according to the steps of process within the same production site (Fig. 4). Diversity was also shown within the other species involved; the five strains of *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* clustered together, and the same was seen for the six isolates of *Ped. acidilactici*. The results show the intra-species diversity of the strains and demonstrate the biodiversity of the isolates from the same production site but indicate that the strains from the same production site are genetically closer than with those from the other production sites.

### Discussion

The study has shown a fall in pH and rise in titratable acidity during the acidification of dolo and pito wort, similar to spontaneous lactic acid fermentation of maize (Halm *et al.* 1993; Hounhouigan *et al.* 1993b; Olsen *et al.* 1995), millet (Efiuvwevwere and Akona 1995; Zvauya *et al.* 1997; Lei and Jakobsen 2004) and sorghum (Odufa and Adeyele 1985; Achi 1990; Nout 1991; Sulma *et al.* 1991; Gassem 1999; Kunene *et al.* 2000; Muyanja *et al.* 2003). Concurrent with the fall in pH, gram-negative bacteria were eliminated. The use of polyphasic taxonomy approach has led to describe accurately the characteristics and the diversity of predominant LAB occurring in dolo and pito worts fermentation. The sugar fermentation patterns of the isolates identified as *Lact. fermentum* in this study compared well with that reported by Hounhouigan *et al.* (1993b). However, *Lact. fermentum* strains have previously been described as positive (>90%) for ribose,



galactose, glucose, fructose, maltose, melibiose, saccharose and raffinose, and negative (<10%) for esculin, melezitose, amygdalin, mannitol, rhamnose and sorbitol (Hammes *et al.* 1992; Seseña *et al.* 2004). Our major difference was the fermentation of amygdalin, esculin, gluconate and D-xylose by 13%, 25% and 95% of the isolates, respectively.

The predominance of *Lact. fermentum* in the entire process of dolo and pito wort in the present study appears to be unique. *Lactobacillus fermentum*, already present in significant numbers in the sorghum grain, occurred in a high number during the malting process (unpublished results). The other bacteria identified, i.e. *Lact. delbrueckii*, *Ped. acidilactici*, *L. lactis* and *Leuc. lactis* comprised a minor fraction of the population at all the steps of the process. Moreover, those bacteria occurred in an irregular and inconsistent way and no distinct microbial succession at the species level was evident. They were not isolated in the Samandin site which had implemented a washing and cleaning procedure with soap and local potash between each batch. In previous studies, *Lact. fermentum* has been reported to be dominant in various cereal sourdoughs, but usually associated to several other species (Fields *et al.* 1981; Sulma *et al.* 1991; Hounhouigan *et al.* 1993a; Johansson *et al.* 1995; Olsen *et al.* 1995; Hamad *et al.* 1997; Hayford *et al.* 1999). *Lactobacillus fermentum* was present in significant numbers but not dominant in the spontaneous fermentation of other cereal-based food like ogi and kunun-zaki, from fermented sorghum or millet (Faparusi *et al.* 1973; Olasupo *et al.* 1997). While *Lact. plantarum* and *Streptococcus lactis* have been found to be dominant in ogi-baba, fermented sorghum gruel (Odunfa and Adeyele 1985). In the present work, a high uniformity at the species level was observed between sites and processing steps for the dominating of *Lact. fermentum*. However, through the ITS-PCR/RFLP profiles and PFGE analysis, a pronounced biodiversity was observed at subspecies and strain levels. Diversity was also observed through the carbohydrate fermentation patterns. The diversity seems to reflect the production site and the step of processing in particular. Several strains of *Lact. fermentum* were involved from the beginning to the end of fermentation, and no particular strain became dominant. *Lactobacillus fermentum* appears then to be an obvious candidate as a potential starter culture for a controlled fermentation of the wort, but the biodiversity of the strains has to be considered in the selection of the strains. In an earlier study, Lei and Jakobsen (2004) have

also showed the predominance of *Lact. fermentum* in koko production, a fermented millet product from the same region Tamale in Ghana, and they revealed the biodiversity of *Lact. fermentum* strains by REA-PFGE and by multivariate data analysis. For other African traditional foods, the biodiversity of *Lact. fermentum* was demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR fingerprint patterns for fermented maize (Hayford *et al.* 1999) and fermented cassava (Kostinek *et al.* 2005). In a non-African environment, the biodiversity of *Lact. fermentum* involved in 'Almagro' eggplant fermentation is also shown by RAPD-PCR analysis (Seseña *et al.* 2004). The major role of *Lact. fermentum* in the production of dolo and pito wort is acidification, which prepares the wort for the subsequent yeast fermentation. A lactic acid fermentation already seen during the malting process of sorghum grains, with the involvement of *Lact. fermentum* as dominant species (unpublished results), is likely to give *Lact. fermentum* a competitive advantage. An advantage further strengthened during the acidification of the wort. The role of *Lact. fermentum* in aroma formation has been described for fermented maize (Halm *et al.* 1993; Annan *et al.* 2003) and it may also apply for dolo and pito. The lactic acid fermentation step in the processing of African sorghum beers brings the characteristic sour taste, storage qualities and also assures consumer safety of the final product as reported by Haggblade and Holzapfel (1989). The ability of *Lact. fermentum* to ferment wet-cooked sorghum flour with an increase of free amino acid and total protein content has also been reported (Correia *et al.* 2004). Finally, *Lact. fermentum* may add beneficial effect to the final products by the formation of exopolysaccharides (EPS) which may act in foods, as viscosifying agents, stabilizers, emulsifiers, gelling agents or water-binding agents (de Vuyst and Degeest 1999).

Concerning the other LAB found in dolo and pito wort, *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* has been found in *bushera*, Ugandan traditional fermented beverage prepared from sorghum and millet malt flour, occurring in low numbers (Muyanja *et al.* 2003). *Lactobacillus delbrueckii* has also been isolated from wheat sourdough (Corsetti *et al.* 2001). The fact that *Lact. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* in our case was not isolated from the raw material, but mainly from the acidified samples, may be attributed to the association of this species to the environment of the earthenware pots used for the production. *Pediococcus acidilactici* has been found in mawè, a fer-

**Figure 4** Dendrogram based on Dices coefficient of similarity with the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages (UPGMA) of PFGE-Asc I fingerprint patterns of the isolates of *Lactobacillus fermentum*, *Lacto delbrueckii* subsp. *delbrueckii* and *Pediococcus acidilactici*, isolated from the processing of dolo and pito wort at Zone 1(ZN) and Nyankpala (N) production sites. For the codes of the isolates, the letters indicate the production sites (ZN or N); the first digit indicates the step of production (1–8, see Fig. 1) and the second digit, the number of the isolate. Do indicates dolo and Y indicates yloga extract.

mented maize product (Hounhouigan *et al.* 1993b); Lei and Jakobsen (2004) also identified *Pediococcus* spp. during the fermentation of koko. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* and *Ped. acidilactici* did not occur at the Samandin production site where a uniformity of *Lact. fermentum* species was observed throughout the different stages of production. This seems to be the result of the specific procedure of cleaning the earthenware pots used at this site as previously described. This result indicates that the fermentation can be controlled by the implementation of good manufacture practices (GMP).

*Lactobacillus fermentum* occurred in the final products, dolo and pito at the level of 5–6 log CFU ml<sup>-1</sup>, and it is probably attributed to the fact that the same earthenware pots are used for the acidification and alcoholic fermentation. This could have an advantage for the preservation of the products and is attributed to antimicrobial activity and potential probiotic effect of LAB. However, according to Haggblade and Holzapfel (1989), LAB can also contribute to the spoilage of sorghum beers by oversouring it.

The acidification of dolo and pito wort according to Mossi's and Dargarti's traditional processes is a separate step resulting in natural lactic acid fermentation where *Lact. fermentum* is the dominant species (75–100%) followed by *Lact. delbrueckii* (5–26%) and *Ped. acidilactici* (6–13%). The strains identified displayed a great genetic diversity. Therefore, a mixture of *Lact. fermentum* strains selected on the basis of their potential technological properties can be used as starter culture for controlled fermentation of dolo and pito wort.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the Danish International Development Assistance (DANIDA) ENRECA project for the financial support of this work. We would like to thank Mamounata Congo for the collection of isolates at Ouagadougou; Richard Glover from University for Development Study (Tamale, Ghana) for the facilities given during the collection of the isolates at Tamale; and Per Christensen for the technical assistance with the genotyping of the isolates at KVL.

## References

- Achi, O.K. (1990) Microbiology of obilor, a Nigerian fermented non alcoholic beverage. *J Appl Bacteriol* **69**, 321–325.
- Amoa-Awua, W.K.A., Appoh, F.E. and Jakobsen, M. (1996) Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima. *Int J Food Microbiol* **31**, 87–98.
- Annan, N.T., Poll, L., Sefa-Deddeh, S., Plahar, W.A. and Jakobsen, M. (2003) Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture maize dough. *J Appl Microbiol* **94**, 462–474.
- Correia, I., Nunes, A., Duarte, F.I., Borros, A. and Delgadillo, I. (2004) Sorghum fermentation followed by spectroscopic techniques. *Food Chem* **90**, 853–859.
- Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N. and Gobetti, M. (2001) Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeast from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of southern Italy. *Int J Food Microbiol* **64**, 95–104.
- Demuyakor, B. and Ohta, Y. (1991) Characteristics of pito yeast from Ghana. *Food Microbiol* **8**, 183–193.
- de Vuyst, L. and Degeest, B. (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 153–177.
- Efiuvwevere, B.J.O. and Akona, O. (1995) The microbiology of kunun-zaki, a cereal beverage from northern Nigeria, during the fermentation (production) process. *World J Microbiol Biotechnol* **11**, 491–493.
- Ekundayo, J.A. (1969) The production of pito, a Nigerian fermented beverage. *J Food Technol* **4**, 217–225.
- Faparusi, S.I., Olofinboba, M.O. and Ekundayo, J.A. (1973) The microbiology of burukutu beer. *Fur All Mikrobiol* **13**, 563–568.
- Fields, M.L., Hamed, A.M. and Smith, D.K. (1981) Natural lactic acid fermentation of corn meal. *J Food Sci* **46**, 900–902.
- Gashe, B.A. (1985) Involvement of lactic acid bacteria in the fermentation of Tef (*Eragrostis tef*), an Ethiopian fermented food. *J Food Sci* **50**, 800–801.
- Gassem, M.A.A. (1999) Study of micro organisms associated with the fermented bread (khamir) produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia. *Int J Food Microbiol* **86**, 221–225.
- Glover, R.L.K., Abaidoo, R.C., Jakobsen, M. and Jespersen, L. (2005) Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from a survey of pito production sites in various parts of Ghana. *Syst Appl Microbiol* **28**, 755–761.
- Gregersen, T. (1978) Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Eur J Appl Microbiol* **5**, 123–127.
- Guiraud, J.P. (1998) *Microbiologie Alimentaire Ed.* Paris, France: DUNOD, 652 p.
- Haggblade, S. and Holzapfel, W.H. (1989) Industrialization of Africa's indigenous beer brewing. In *Industrialization of Indigenous Fermented Foods* ed. Steinkraus, K.H. pp. 191–283. New York: Marcel/Dekker.
- Halm, M., Lillie, A., Sørensen, A.K. and Jakobsen, M. (1993) Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize dough for kenkey production in Ghana. *Int J Food Microbiol* **19**, 135–143.
- Hamad, S.H., Dieng, M.C., Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F. (1997) Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *J Appl Microbiol* **83**, 764–770.

- Hammes, W.P., Weiss, N. and Holzapfel, W. (1992) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, Vol. II, 2nd edn ed. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder W., Schleifer, K.-H. pp. 1535–1594. New York: Springer-Verlag.
- Hayford, A.E., Petersen, A., Vogensen, F.K. and Jakobsen, M. (1999) Use of conserved randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments and RADP pattern for characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian fermented maize dough. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3213–3221.
- Hounhouigan, D.J., Nout, M.J.R., Nago, C.M., Houben, J.H. and Rombouts, F.M. (1993a) Characterization and frequency distribution of lactic acid bacteria involved in the processing of mawè, a fermented maize dough from Benin. *Int J Food Microbiol* **18**, 279–287.
- Hounhouigan, D.J., Nout, M.J.R., Nago, C.M., Houben, J.H. and Rombouts, F.M. (1993b) Composition and microbiological and physical attributes of mawè, a fermented maize dough from Benin. *Int J Foods Sci Technol* **28**, 513–517.
- Johansson, M.L., Sanni, A., Lonner, C. and Molin, G. (1995) Phenotypically based taxonomy using API 50 CH of lactobacilli from Nigerian Ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *Int J Food Microbiol* **25**, 159–168.
- Journe, B. (1997) *Production, vente et consommation de la bière de mil (dolo) à Ouagadougou: aspects économiques, techniques et culturels*. Sorbonne (France): Mémorial de Maîtrise de Géographie, Université Paris IV.
- Kayode, P.A.P., Adegbiidi, A., Linnermann, A.R., Nout, R.M.J. and Hounhouigan, J.D. (2004) Consumers' quality perception of farmers' varieties of sorghum and derived foods in Benin. In *Proceedings of the 2nd International Workshop on Food Based Approaches for Healthy Nutrition in West Africa*, Ouagadougou, Burkina Faso, 23–28 November 2003, pp. 90–105.
- Konlani, S., Delgenes, J.P., Moletta, R., Traoré, A. and Doh, A. (1996) Isolation and physiological characterization of yeasts involved in sorghum beer production. *Food Biotechnol* **10**, 29–40.
- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W.H. and Franz, C.M.A.P. (2005) Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for preparation of Gari, a traditional African food. *Syst Appl Microbiol* **28**, 527–540.
- Kunene, N.F., Geornaras, I., von Holy, A. and Hastings, J.W. (2000) Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1084–1092.
- Lei, V. and Jakobsen, M. (2004) Microbiological characterization and probiotic potential of koko and koko sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *J Appl Microbiol* **96**, 384–397.
- Muyanja, C.M.B.K., Narvhus, J.A., Treimo, J. and Langsrud, T. (2003) Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *Int J Food Microbiol* **80**, 201–210.
- Nout, M.J.R. (1991) Ecology of accelerated natural lactic fermentation of sorghum-based infant food formulas. *Int J Food Microbiol* **4**, 293–301.
- Odufa, S.A. (1985) African fermented Food. In *Microbiology of Fermented Food*, Vol. 2 ed. Wood, B.J.B. pp. 155–191. Essex, England: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.
- Odufa, S.A. and Adeyele, S. (1985) Microbiological changes during the traditional production of ogi-baba, a West African fermented sorghum gruel. *J Cereal Sci* **3**, 180–193.
- Olasupo, N.A., Olukaya, D.K. and Odufa, S.A. (1997) Identification of lactobacillus species associated with selected African fermented foods. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* **52c**, 105–108.
- Olsen, A., Halm, M. and Jakobsen, M. (1995) The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation. *J Appl Bacteriol* **79**, 506–512.
- Sanni, A.I. and Lonner, C. (1993) Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiol* **10**, 517–523.
- Sefa-Dedeh, S. and Asante, S. (1988) Traditional alcoholic beverage from cereal in Ghana: processing of pito and burukutu in the Greater Accra Region, Ghana. *KIFP Food Syst Res Rep*, No. 1, 39pp.
- Sefa-Dedeh, S., Sanni, A.I., Tetteh, G. and Sakyi-Dawson, E. (1999) Yeasts in traditional brewing of pito in Ghana. *World J Microbiol Biotechnol* **15**, 593–597.
- Seseña, S., Sánchez, I. and Palop, L. (2004) Genetic diversity (RAPD-PCR) of lactobacilli isolated from 'Almagro' eggplant fermentation from two seasons. *FEMS Microbiol Lett* **238**, 159–165.
- Sulma, I., Larry, R.S. and Kirleris, A. (1991) Isolation and characterization of microorganisms associated with production of Sudanese kirsra. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2529–2533.
- van der Aa Kühle, A., Jespersen, L., Glover, R.L.K., Diawara, B. and Jakobsen, M. (2001) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer. *Yeasts* **18**, 1069–1079.
- Yao, A.K., Kadio, G., Coulybaly, A. and et Agbo, G.Z. (1995) Production du 'Tchapalo' à partir du sorgho en Côte d'Ivoire. In *Processing and industrial utilization of sorghum and related cereals in Africa. Proceeding of the OUA/STRC-SAFGRAD regional symposium* ed. Menyonga, J.M., Bezuneh, T., Nwasike, C.C., Sedogo, P.M. and Tenkouano, A. Ouagadougou, Burkina Faso, 22–26 November 1993, pp. 55–60.
- Zvauya, R., Mygochi, T. and Parawira, W. (1997) Microbial and biochemical changes occurring during production of masvuvu and mangisi, traditional Zimbabwean beverages. *Plant Foods Human Nutr* **51**, 43–51.

## ORIGINAL ARTICLE

# Technological properties of *Lactobacillus fermentum* involved in the processing of dolo and pito, West African sorghum beers, for the selection of starter cultures

H. Sawadogo-Lingani<sup>1</sup>, B. Diawara<sup>1</sup>, A.S. Traoré<sup>2</sup> and M. Jakobsen<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Département Technologie Alimentaire (DTA)/IRSAT/CNRST, Ouagadougou, Burkina Faso

<sup>2</sup> Université de Ouagadougou/UFR – SVT/CRSBAN, Ouagadougou, Burkina Faso

<sup>3</sup> Department of Food Science Food Microbiology, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark

## Keywords

dolo wort, *Lactobacillus fermentum*, sorghum beer, starter cultures, technological properties.

## Correspondence

H. Sawadogo-Lingani, Département Technologie Alimentaire (DTA)/IRSAT/CNRST, Ouagadougou 03 BP 7047, Burkina Faso.  
E-mail: hagretou@yahoo.fr

2007/0690: received 29 April 2007, revised 5 September 2007 and accepted 5 September 2007

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03638.x

## Abstract

**Aim:** Technological properties of *Lactobacillus fermentum* isolates involved in spontaneous fermentation of dolo and pito wort were examined to select starter cultures.

**Methods and Results:** 264 isolates were screened for antimicrobial activity, acidifying activity, exopolysaccharides (EPSs) and amylase production. An antimicrobial activity was detected for 33.3%, 31.8%, 22.7% and 15.9% of the isolates towards *Staphylococcus aureus* enterotoxin A producer, *Staphylococcus aureus* enterotoxin A and B producer, *Escherichia coli* and *Listeria innocua*, respectively. A similarity was found between the isolates which were clustered in four groups according to their rates of acidification of sorghum malt broth. The faster acidifying group of isolates (43.48%) had a rate of acidification evaluated as  $\Delta\text{pH}$  of  $1.14 \pm 0.15$  pH unit after 6 h of fermentation, followed by a second group of isolates (38.08%) with a similar rate of acidification after 9 h of fermentation. From the isolates endowed with an antimicrobial activity, 5.76% belonged to the faster acidifying group and 40.38% belonged to the second group. 88.7% of the isolates had the ability for producing EPSs but not amylase.

**Conclusion:** *Lactobacillus fermentum* ferments dolo and pito wort by lowering the pH and providing organic acids, EPSs and antimicrobial compounds.

**Significance and Impact of the Study:** Strains with a rapid rate of acidification, an antimicrobial activity and producing EPSs are suggested to have potential for starter cultures.

## Introduction

Sorghum [*Sorghum bicolor* (L) Moench] is one of the cereals which constitute a staple food for people in tropical region of Africa and Asia. In West Africa, sorghum grains are malted and used to produce traditional beers like dolo common to the people of Burkina Faso, Ivory Coast and Mali (Konlani *et al.* 1996; Yao *et al.* 1995), and pito common in Ghana, Togo and Nigeria (Demuyakor and Ohta 1991; Sanni and Lonner 1993). Dolo and pito are popular food drinks in West Africa, produced and sold by women with important socio-economic implica-

tions. The traditional processing of dolo and pito is complex and involves milling of malted sorghum, mashing, acidification, cooking, cooling and the alcoholic fermentation of the final wort by dried yeast taken from a previous fermentation (Sawadogo-Lingani *et al.* 2007). *Saccharomyces cerevisiae* has been identified as predominant in the dried yeast used (van der Aa Kühle *et al.* 2001; Glover *et al.* 2005). In Burkina Faso, the final wort is also appreciated as nonalcoholic drink by people and a part is sold by the producers. The desired properties of these beverages are their nutritional value, taste, mouth file and fruity aroma. Generally, drinks are not taken as



food but in Africa, cereals-based beverages are considered as foods because of their nutritional value and their contribution to the diet of people. The traditional beer *amgba*, for example, produced from malted sorghum in Cameroon, has been described nutritionally better compared to sorghum grains, and constitutes a source of sugars, proteins, vitamins, iron, manganese, magnesium, phosphorous and calcium (FAO 1995). Pito has also been described as slightly sweet to very sour in taste, opaque, lightly alcoholic (2–3%) and contains organic acids, sugars, amino acids, proteins and vitamins (Bansah 1990). In our previous study, *Lactobacillus fermentum* has been found to be the predominant species involved in the spontaneous acidification of dolo and pito wort, with a genetic diversity at strains level (Sawadogo-Lingani et al. 2007). We found also the presence of yeast and *Lact. fermentum* in the ready to drink products, dolo and pito, at important level. Lactic acid bacteria (LAB) are well known to be able to produce a various range of compounds which contribute to the taste, flavour, colour, texture, consistency, nutritional quality and safety of fermented products (Davidson 1997; Ayad et al. 2004). For African sorghum beers, it has also been reported that the lactic acid fermentation step provides the characteristic sour taste, storage qualities and also assures consumer safety of the final product (Haggblade and Holzapfel 1989). *Lactobacillus fermentum* has been found to be involved in various cereals sourdoughs and spontaneously fermented cereals-based products but usually associated with other species (Sulma et al. 1991; Hounhouigan et al. 1993a; Johansson et al. 1995; Olsen et al. 1995; Hamad et al. 1997; Olasupo et al. 1997; Hayford et al. 1999; Lei and Jakobsen 2004). Previous investigations have shown the formation of antimicrobial compounds, exopolysaccharides (EPSs) and amylase by some strains of *Lact. fermentum* (Yan and Lee 1997; Agati et al. 1998; Sanni et al. 2002; Calderon-Santoyo et al., 2003; Ayad et al. 2004; Savadogo et al. 2004; Kostinek et al. 2005). The specific antimicrobial mechanisms of LAB exploited in the biopreservation of foods include the production of organic acids, hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl and bacteriocins (De Vuyst and Vandamme 1994; Ouwehand 1998; Oyetayo et al. 2003), which have antagonistic activity against many micro-organisms including food spoilage micro-organisms and food-borne pathogens. To our knowledge, no investigation has dealt with the technological properties of *Lact. fermentum* strains involved in the processing of dolo and pito. The present study was undertaken in the aim at determining technological properties of *Lact. fermentum* strains involved in the production of dolo and pito wort, mainly their antimicrobial activity, their acidifying activity, and their ability of producing amylase and EPSs, to select efficient

strains to be used as starter cultures for a controlled fermentation of the wort.

## Materials and methods

### Origin of *Lact. fermentum* isolates

A total of 264 isolates of *Lact. fermentum* isolated throughout the traditional processing of dolo in Ouagadougou (Burkina Faso) at Zone 1 (65 isolates) and Samandin (70 isolates) production sites, and of pito in Tamale (Ghana) at Nyankpala (71 isolates) and Tamale town (59 isolates) production sites, were used. These isolates have been identified in our previous investigation (Sawadogo-Lingani et al. 2007). The isolates were maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  in MRS broth (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) with 50% (v/v) glycerol (Merck, Darmstadt, Germany), and were cultured twice on MRS agar (Oxoid) in anaerobic conditions at  $37^{\circ}\text{C}$  for 48 h, before use for the experiments.

### Antimicrobial activity of the isolates

The antimicrobial activity was determined by an agar spot test realized with modified MRS agar [0.2% (w/v) glucose (Merck) and 1.2% (w/v) agar (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)] under anaerobic conditions to grow *Lact. fermentum* isolates (tested strains) to restrict the extent of acid production and to minimize the formation of hydrogen peroxide and acetic acid (Schillinger and Lücke 1989). *Staphylococcus aureus* enterotoxin A producer, *S. aureus* enterotoxin A and B producer, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* ATTC 33090 obtained from Department of Food Science, Food Microbiology, University of Copenhagen, were used as pathogen indicator strains. The indicator strains were maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  in nutrient broth with 50% (v/v) glycerol and cultured twice aerobically on nutrient agar (Difco, Detroit, MI, USA) at  $37^{\circ}\text{C}$ , before use. Each tested strain was cultured in 10 ml MRS broth at  $37^{\circ}\text{C}$  for 16 h. 2.5  $\mu\text{l}$  of tested strain culture were inoculated on modified MRS agar plates: three tested strains and one negative control were inoculated on one plate. MRS broth was used as negative control. The plates were incubated anaerobically in an anaerobic jar with Anaerocult A (Merck) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h to allow colonies to develop. Each indicator strain was cultured in 10 ml of nutrient broth (Difco) at  $37^{\circ}\text{C}$  overnight (16 h). 100  $\mu\text{l}$  of overnight culture of each indicator strain were inoculated into 7 ml of soft nutrient agar [0.7% (w/v) agar] maintained at  $45^{\circ}\text{C}$  and poured over the modified MRS plates on which the tested strains were grown. The plates were incubated again at  $37^{\circ}\text{C}$  aerobically to allow the indicator strains to develop.

The sizes of the inhibition zones were measured (from the edge of the colony of the tested strain to the end of clear zone) after 24 h of incubation and re-measured after 48 h. The inhibition was scored positive if the width of the clear zone around the colonies of the tested strains was 1 mm or larger. The screening was carried out twice; after the first screening, positive strains were selected and examined a second time to confirm the results.

#### Rate of acidification of sorghum malt broth

Duplicate trial fermentations were realized with each isolate by using an autoclaved sorghum malt broth as substrate and the change in pH during time was measured. For the preparation of the sorghum malt broth, an aqueous suspension of 15% (w/v) sorghum malt flour was prepared with distilled water, shaken for 10 min and let to settle for 1 h. The supernatant was collected and the pellet was heated to boiling point before mixing with the supernatant. The mixture was then shaken for 10 min, let to settle for 1 h and the supernatant was collected. All the supernatants were mixed and constituted the sorghum malt broth used for the trial fermentations. The pH and the total soluble matter (in degree Brix) of the sorghum malt broth were measured by using a pHmeter (Consort P201 Scientific instrument, Turnhout, Belgium) and a refractometer (Hand refractometer, Krüss Optronic GmbH, Hamburg, Germany), respectively. The broth was distributed in flasks (200 ml per flask), autoclaved at 121°C for 20 min and cooled at room temperature (30°C). *Lactobacillus fermentum* cultures used as inoculum were obtained as following: a loopful of each isolate collected from a MRS agar plate was cultured in 10 ml of MRS broth and incubated at 37°C for 24 h; 100 µl of the 24 h culture were transferred in 10 ml of MRS broth and incubated at 37°C for 16 h (overnight). The overnight culture was centrifuged (Sigma 1k15 Struers, Kεbolab) at 5000 g for 10 min at 4°C, the supernatant was removed and the pellet was washed twice with sterilized diluent [0.1% (w/v) peptone (Difco), 0.85% (w/v) NaCl (Sigma), pH 7.2 ± 0.2] and resuspended in 10 ml of sterilized diluent; this suspension was used as the isolate inoculum, and 2 ml were sampled for viable cells count on MRS agar. Flasks containing 200 ml of autoclaved sorghum malt broth were inoculated in duplicate with 2 ml of the isolate inoculum, and incubated at 37°C for 24 h. Every 3 h, 10 ml was sampled under aseptic conditions for pH measurement (Consort P201 Scientific instrument). 200 ml of autoclaved sorghum malt broth was used as negative control. The rate of acidification was calculated as ΔpH according to Ayad *et al.* (2004): ΔpH = pH at time – pH zero time. At each sampling,

the isolates were grouped according to their rates of acidification. For each group of isolates, the average of rates of acidification and the standard deviation were calculated.

#### Exopolysaccharides production

The screening of the isolates for EPSs production was carried out according to the method described by Guiraud (1998). The isolates cultured on MRS agar were streaked onto LTV agar [0.5% (w/v) tryptone (Difco), 1% (w/v) meat extract (Fluka, Biochemika, Chemie GmbH, Buchs, Switzerland), 0.65% (w/v) NaCl (Sigma), 0.8% (w/v) potassium nitrate (Merck, KgaA), 0.8% (w/v) sucrose (PA Panreac Guimica SA, Barcelona, Espana), 0.1% (v/v) Tween 80 (Merck), 1.7% (w/v) agar (Sigma), pH 7.1 ± 0.2] and incubated at 30°C for 48 h. The sticky aspect of the colonies was determined by testing them for slime formation using the inoculated loop method (Knoshaug *et al.* 2000). The isolates were considered positively slimy producer if the length of slime was above 1.5 mm. The positive isolates were confirmed using MRS-sucrose broth without glucose and peptone used by Pidoux *et al.* (1990) [1% (w/v) meat extract, 0.5% (w/v) yeast extract (Fluka, BioChemika), 5% (w/v) sucrose (PA Panreac Guimica), 0.2% (w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O (Merck), 0.5% (w/v) sodium acetate trihydrate (Merck), 0.2% (w/v) triammonium citrate anhydrous (Fluka, BioChemika), 0.02% (w/v) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Merck), 0.005% (w/v) manganese (II) sulfate monohydrate (Merck), 0.1% (v/v) Tween 80, pH 5.0 ± 0.2]. The isolates were cultured in MRS-sucrose broth and incubated at 30°C for 24 h. A volume of 1.5 ml of the 24 h culture was centrifuged at 5000 g for 10 min (4°C) and 1 ml of the supernatant was put in a glass tube and an equal volume of ethanol 95% was added. In presence of EPSs, an opaque link is formed at the interface. The positive isolates were noted according to the intensity of the opaque link.

#### Amylase formation

The ability of the isolates to produce amylase was determined according to the method described by Sanni *et al.* (2002). Three lines streak of each isolate were made with an inoculation needle on modified MRS agar (De Man *et al.* 1960) without glucose but with 2% (w/v) potato-soluble starch as the only carbon source [1% (w/v) tryptone, 1% (w/v) meat extract, 0.5% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) potato-soluble starch (Prolabo, Paris, France), 0.2% (w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.5% (w/v) sodium acetate, 0.2% (w/v) triammonium citrate, 0.02% (w/v) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.005% (w/v) manganese sulfate, 1% (v/v) Tween 80, pH 5.0 ± 0.2]. The plates were incu-

bated at 37°C for 48 h in an anaerobic jar with Anaerocult A (Merck). The culture plates were covered by spraying with Lugol's iodine [0.33% (w/v) iodine (Pro-labo), 0.66% (w/v) potassium iodide (Labosi, Paris, France)] to detect starch hydrolysis. As reference to an amylase-positive strain, *Bacillus subtilis* B3 (Ouoba et al. 2004) was included as positive control strain. Growth or not of the isolates on MRS-starch agar was also noted; the isolates which were able to grow on this media were selected and the experiment was performed again using other media such as MRS-2% (w/v) starch broth, MRS agar-2% starch with 0.05% (w/v) CaCl<sub>2</sub> (Merck), MRS agar-2% starch with 0.05% (w/v) CaCO<sub>3</sub> (Labosi). CaCl<sub>2</sub> and CaCO<sub>3</sub> favour the production of amylase (Giraud et al. 1993, 1994). The isolates were inoculated in 10 ml of MRS-2% starch broth, incubated at 37°C for 48 h and the pH was measured; sterilized MRS-2% starch broth was used as negative control. The isolates were also inoculated on MRS agar-2% starch with CaCl<sub>2</sub> and MRS agar-2% starch with CaCO<sub>3</sub>, and their growth was examined after incubation at 37°C for 48 h under anaerobic conditions.

## Results

### Antimicrobial activity of the isolates

From the 264 isolates of *Lact. fermentum* examined by the agar spot technique, a total of 33.33% exerted antagonism against at least one of the four indicator strains used, i.e. *S. aureus* enterotoxin A producer with inhibition zones ranging between 1 and 15 mm (Table 1). 31.81% exerted antagonism against *S. aureus* enterotoxin A and B producer with inhibition zones ranging from 1 to 10 mm for most of the isolates. Moreover, 22.72% and 15.9% inhibited the growth of *E. coli* and *Lact. innocua*, respectively, with inhibition zones ranging from 1 to 5 mm (Table 1). A total of 12.12% of the isolates screened exerted antagonistic activity against all the four indicator strains (result not shown).

### Rate of acidification of the isolates

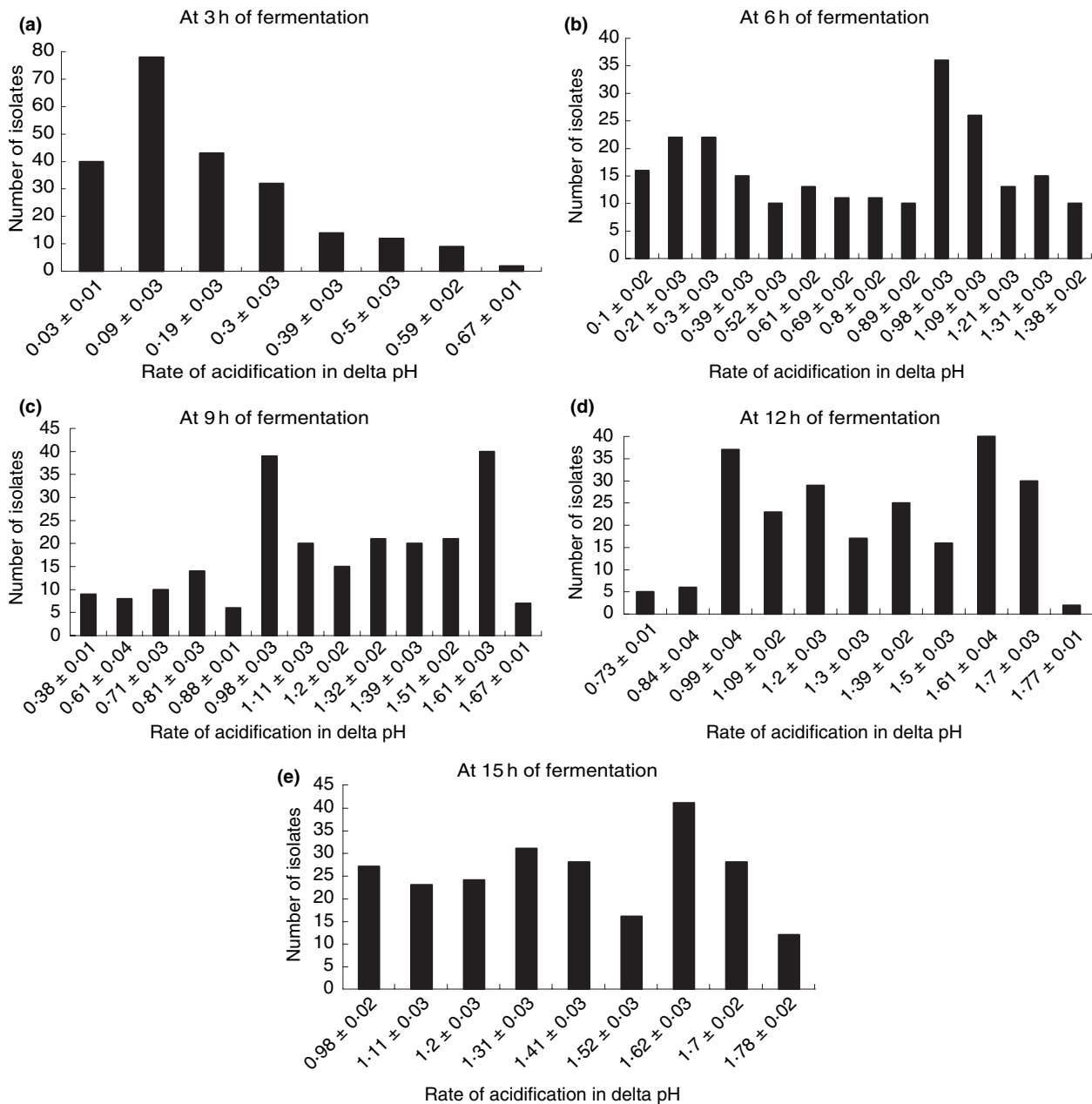
A total of 230 isolates including all the 88 isolates with an antimicrobial activity were screened. The pH of the sorghum malt broth used to evaluate the acidifying activity of the isolates was  $4.89 \pm 0.20$  and its total soluble matter was  $7.2 \pm 0.2$  degrees Brix. As it can be illustrated in Fig. 1a–e, at the sampling times of the fermentation of sorghum malt broth, a similarity was observed between the isolates, which were clustered in different groups according to their rates of acidification, calculated as  $\Delta\text{pH}$  (pH at time – pH zero time). At 3 h of fermentation (Fig. 1a), the 230 isolates were clustered in eight groups with rates of acidification ranging from 0.03 (40 isolates) to 0.67 pH unit (two isolates). The largest cluster contained 78 isolates with a rate of acidification of  $0.09 \pm 0.03$  pH unit; at this time of fermentation, a few isolates (23) had rates of acidification  $\geq 0.5$  pH unit. At 6 h of fermentation (Fig. 1b), 14 clusters were observed with rates of acidification ranging from  $0.1 \pm 0.02$  (16 isolates) to  $1.38 \pm 0.02$  pH unit (10 isolates); two largest clusters were observed and contained 36 and 26 isolates with rates of acidification of  $0.98 \pm 0.03$  and  $1.09 \pm 0.03$  pH unit, respectively. Fig. 1c shows isolates clustered in 13 groups at 9 h of fermentation, with rates of acidification ranging from  $0.38 \pm 0.01$  to  $1.67 \pm 0.01$  pH unit; at this sampling time, two largest clusters containing 38 and 40 isolates were observed with rates of acidification of  $0.98 \pm 0.03$  and  $1.61 \pm 0.03$  pH unit, respectively. As it can be illustrated in Fig. 1d, the isolates clustered in 11 groups with acidification rates ranging from  $0.73 \pm 0.01$  (five isolates) to  $1.77 \pm 0.01$  pH unit (two isolates) at 12 h of fermentation; a few of them (11 isolates) had rates of acidification less than  $0.99 \pm 0.03$ . At 15 h of fermentation, no isolate had a rate of acidification less than  $0.98 \pm 0.02$  pH unit (Fig. 1e). Similar results were recorded at 24 h of fermentation with rates of acidification ranging from  $1.01 \pm 0.01$  to  $1.96 \pm 0.01$  pH unit (results not shown).

**Table 1** Antimicrobial activity of 264 isolates of *Lactobacillus fermentum* against pathogen indicator strains

Indicator strains	Inhibitory spectrum of <i>Lact. fermentum</i> isolates (n = 264)				Percentage of isolates exhibiting antimicrobial activity
<i>Staphylococcus aureus</i> (enterotoxin A producer)	– (176)	+	++ (50)	+++ (10)	33.33 (88/264)
<i>Staphylococcus aureus</i> (enterotoxin A + B producer)	– (180)	+	++ (32)	+++ (7)	31.81 (84/264)
<i>Escherichia coli</i>	– (204)	+	++ (0)	+++ (0)	22.72 (60/264)
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	– (222)	+	++ (0)	+++ (0)	15.9 (42/264)

–, no activity; +, antimicrobial activity with inhibition zone of 1–5 mm; ++, antimicrobial activity with inhibition zone of 6–10 mm; +++, antimicrobial activity with inhibition zone of 11–15 mm.

Values given in parentheses are number of isolates.



**Figure 1** The distribution of *Lactobacillus fermentum* isolates according to their rates of acidification during the trial fermentations of sorghum malt broth. At: (a) 3 h of fermentation, (b) 6 h of fermentation, (c) 9 h of fermentation, (d) 12 h of fermentation, (e) 15 h of fermentation.

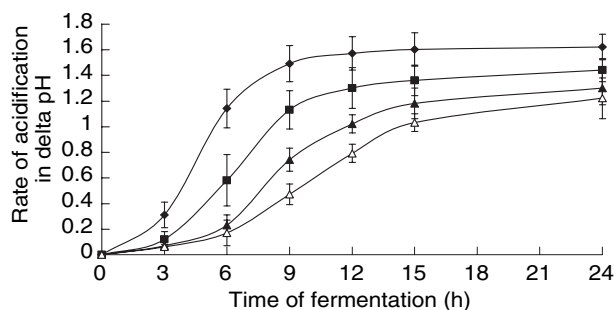
The pH of the spontaneous acidified wort obtained by traditional processing of dolo and pito ranged from 3.5 to 3.8 (our previous investigation); these values were taken as reference to compare the properties of isolates during trial fermentations. Thus, at 3 h of fermentation, none of the isolates showed a rate of acidification  $\geq 0.94$  pH unit (Fig. 1a). While at 6 h of fermentation, 100 isolates (43.48%) showed rates of acidification  $\geq 0.98 \pm 0.03$  pH unit (Fig. 1b, Table 2); these isolates constituted the first faster group of isolates and were

referred to as group 1 (G1). Then at 9 h, a total of 183 isolates had rates of acidification  $\geq 0.98 \pm 0.03$  pH unit, i.e. 83 new isolates (36.08%) compared to the previous sampling step (Fig. 1c, Table 2); those constituted the second faster group of isolates and were referred to as group 2 (G2). At 12 h a third group (G3) with 36 isolates (15.65%) was obtained, and at 15 h of fermentation, a fourth group (G4) with 11 isolates (4.78%) was observed (Fig. 1d,e, Table 2). The evolution of the rates of acidification of each of the four groups of isolates during the

Time of fermentation (h)	Total number of isolates having rates of acidification $\geq 0.94$ pH unit*	New isolates having rates of acidification $\geq 0.94$ pH unit compared to the previous sampling step	
		Number	Percentage
3	0	0	0
6	100	100 (first group of isolates, G1)†	43.48
9	183	83 (second group of isolates, G2)	36.08
12	219	36 (third group of isolates, G3)	15.65
15	230	11 (fourth group of isolates, G4)	4.78
24	230	0	0

\*The rate of acidification was calculated as  $\Delta\text{pH}$  (pH at time – pH zero time) and rates of acidification  $\geq 0.94$  correspond to pH values of 3.5–3.8 of the fermented broths.

†Data given in parentheses are groups of isolates according to their acidifying activity.

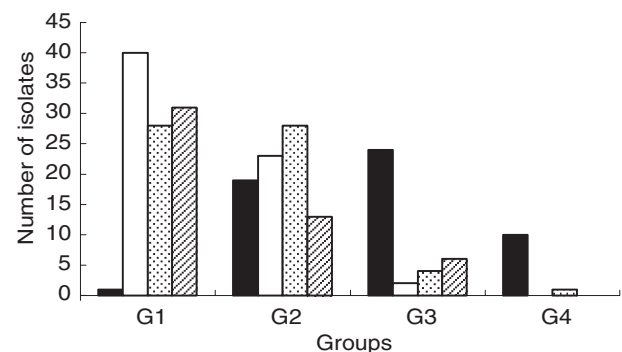


**Figure 2** The evolution of the rates of acidification of *Lactobacillus fermentum* isolates clustered in four groups (◆, G1; ■, G2; ▲, G3 and ▽, G4) during the trial fermentations of sorghum malt broth.

trial fermentations of sorghum malt broth can be illustrated in Fig. 2. For the faster group of isolates (G1), the rates of acidification recorded were  $0.31 \pm 0.09$ ,  $1.14 \pm 0.15$ ,  $1.49 \pm 0.14$  and  $1.57 \pm 0.13$  pH unit at 3, 6, 9 and 12 h, respectively, and the values remained relatively constant until 24 h (Fig. 2). The isolates belonging to group G2 had rates of acidification of  $0.11 \pm 0.07$ ,  $0.58 \pm 0.11$ ,  $1.12 \pm 0.15$  and  $1.27 \pm 0.14$  at 3, 6, 9 and 12 h, respectively. While for the isolates belonging to group G3, the rates of acidification were  $0.23 \pm 0.08$ ,  $0.75 \pm 0.10$ ,  $1.02 \pm 0.07$  and  $1.18 \pm 0.10$  at 6, 9, 12 and 15 h, respectively. For the same times of fermentation, the evolution of the rates of acidification of group G4 isolates were  $0.15 \pm 0.09$ ,  $0.47 \pm 0.13$ ,  $0.77 \pm 0.09$  and  $1.03 \pm 0.07$ , respectively (Fig. 2).

Figure 3 shows the distribution of the isolates according to their origins, i.e. the production sites and their rates of acidification. The faster acidifying group G1 was constituted by the isolates of Samandin, Tamale town and Nyankpala production sites (Fig. 3). The isolates of group G2 came from all the four production sites (Fig. 3), whereas the isolates of groups G3 and G4 mainly came

**Table 2** Grouping of 230 isolates of *Lactobacillus fermentum* according to their acidifying activity during the trial fermentations of sorghum malt broth, pH  $4.89 \pm 0.20$



**Figure 3** The distribution of *Lactobacillus fermentum* isolates belonging to the four groups (G1, G2, G3 and G4) according to the production sites [Zone 1 (■, ZN), Samandin (□, S), Nyankpala (▨, N) and Tamale town (▩, Tt)].

from Zone 1 production site, 24 and 10 isolates, respectively (Fig. 3). The isolates of Zone 1 were less acidifying compared to the other; likewise those from Samandin were more acidifying. No particular distribution was observed for the isolates from Tamale town and Nyankpala. Among the isolates of groups G1, G2, G3 and G4, 16 of 100, 43 of 83, 23 of 36 and six of 11 isolates, respectively, had an antimicrobial activity (result not shown). Most of the 88 isolates which revealed an antagonistic activity belong to group G2 (43 isolates) and group G3 (23 isolates) (result not shown).

So, from an initial pH of  $4.89 \pm 0.20$  of the sorghum malt broths inoculated with *Lact. fermentum* isolates in single starter culture at 0 h of fermentation, pH values of 3.5–3.8 were recorded at 6, 9, 12 and 15 h of fermentation with the isolates of G1, G2, G3 and G4, respectively. These results demonstrate a slight diversity of *Lact. fermentum* isolates with regard to their acidifying activity. The results show clearly also that the duration of the spontaneous fermentation throughout the traditional

processing which normally takes 12–16 h, for a pH of acidified wort ranging from 3.5 to 3.8, can be reduced to 6–9 h by using selected faster acidifying strains as starter cultures for a controlled fermentation of the wort.

#### Ability of *Lact. fermentum* isolates for producing exopolysaccharides

The investigation revealed that from the 230 isolates screened, 88.7% are able to produce EPSs, under the conditions previously described. 17.82% of them (41 of 230) had a good production of EPSs, 42.61% (98 of 230) produced fairly EPSs and 28.26% (46 of 230) produced poorly EPSs (results not shown).

#### Ability of *Lact. fermentum* isolates for producing amylase

It is important to note that a halo surrounding the amylase-positive colonies was not observed with the tested isolates like the positive control strain which has shown a halo of 2 mm. Thus, the ability of the isolates to grow on MRS-starch medium which revealed a low amylolytic activity was noted. 84.78% (195 of 230) of the *Lact. fermentum* isolates were amylase-negative. Moreover, 15.22% of them (35 isolates) could grow on modified MRS agar with starch as the only source of carbon (result not shown). These isolates were able to use starch as only source of carbon for growth, which demonstrates a light amylolytic activity. The addition of CaCl<sub>2</sub> and CaCO<sub>3</sub> to the media to favour the production of amylase by the isolates, did not improve their efficiency and similar results were obtained (result not shown). The low amylolytic activity of the few isolates was confirmed by their growth in MRS-starch broth with a slight decrease in pH. The pH of the broth culture after 48 h of incubation at 37°C was ranged between pH 6.72 and 6.87 compared to the sterilized MRS-starch broth used as negative control of which the pH ranged between pH 6.90 and 6.96 (results not shown).

#### Discussion

This study gives details on the role of *Lact. fermentum*, the dominant species involved in the natural acidification of the wort through the traditional processing of West African sorghum beers, dolo and pito. The results revealed that an interesting proportion of *Lact. fermentum* isolates examined, showed an antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. coli* and *Lact. innocua*. The levels of the antimicrobial activity were high for *S. aureus* but low for *E. coli* and *Lact. innocua*. A similar result was observed by Lei and Jakobsen (2004) who reported inhibition zones of 0.5–2 mm towards *Lact. innocua*. This

antimicrobial activity was conducted on modified MRS agar with low content of glucose (0.2%) and under anaerobic conditions, to minimize the formation of acid and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), so that the inhibition should not be caused by those products but by other compounds such as bacteriocins (Schillinger and Lücke 1989). To this end, a strain of *Lact. fermentum* has been found to be Fermentcin B producer, a bacteriocin stable at 100°C for 30 min and in pH ranged from 3.0 to 8.0 (Yan and Lee 1997). Savadogo *et al.* (2004) reported also a bacteriocin activity for *Lact. fermentum* strain isolated from Burkina Faso-fermented milk towards *S. aureus* ATCC 25293 and *E. coli* 105182 CIP. In other respects, Kostinek *et al.* (2005) detected a high production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and bacteriocin by heterofermentative strains of LAB isolated from fermented cassava, among those *Lact. fermentum*. Other previous investigations reported an antimicrobial activity of LAB isolated from African-fermented foods (Mensah *et al.* 1991; Simango and Rukure 1992; Halm *et al.* 1993; Olsen *et al.* 1995). The antimicrobial properties of starter cultures are important for the safety of the consumers.

As many of our *Lact. fermentum* isolates were found to be faster acidifying strains, there is a good reason to believe that the acidification is their major role in the processing of dolo and pito. *Lactobacillus fermentum* acidifies the wort by lowering its pH, favourable for the growth of yeast during the alcoholic fermentation. The decreasing of pH has been well demonstrated during the spontaneous lactic fermentation of cereals-based products where *Lact. fermentum* was involved (Sulma *et al.* 1991; Halm *et al.* 1993; Hounhouigan *et al.* 1993b; Olsen *et al.* 1995; Lei and Jakobsen 2004). *Lactobacillus fermentum* Ogi E1, an amylolytic strain isolated from Ogi, a Benin sourdough, has been found to be acid-tolerant, well adapted to acid conditions that develop during natural fermentation of cereals dough (Calderon Santoyo *et al.* 2003). This acid tolerance may partly explain the dominance of *Lact. fermentum* in various traditional African sourdoughs.

Our results demonstrated also that most of *Lact. fermentum* strains isolated from dolo and pito processing were able to produce EPSs, which should explain the fairly slimy aspect of the acidified wort that we observed during the sampling (unpublished result). Moreover, it has been reported that EPSs produced by LAB can be a capsule, closely attached to the bacterial cell, or loosely attached or excreted as slime (Sutherland 1977; Cerning 1990). A large number of lactobacilli have been investigated for EPSs production and the species usually associated were *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*,

*Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* (Pidoux et al. 1990; Tallon et al. 2003; Martensson et al. 2003; De Vuyst et al. 2001). *Lactobacillus fermentum* strains isolated from dairy products have also been found as EPSs producers (Ayad et al. 2004). The formation of EPSs by LAB may function in foods, as viscosifying agents, stabilizers, emulsifiers, gelling agents or water-binding agents (van den Berg et al. 1995; De Vuyst et al. 2001), and may play important role in the rheological behaviour and texture of the products (Sikkema and Oba 1998; De Vuyst and Degeest 1999). Probably these functions may also apply for dolo and pito wort, with an effect on the final products, dolo and pito. EPSs production seems to be an important property of *Lact. fermentum* in dolo and pito wort.

*Lactobacillus fermentum* isolates involved in the acidification of dolo and pito wort are not able to produce amylase. Only a few of them have shown a low amylolytic activity, just to maintain themselves alive on modified MRS agar media with starch as the only carbon source. That confirms our previous results on the starch fermentation tests with API 50 CHL system where negative reactions were obtained for all the isolates of *Lact. fermentum* (Sawadogo-Lingani et al. 2007). This result should be due to the nature of the substrate used for the production of dolo, i.e. the malted sorghum which contained already fermentable sugars to be used by the isolates. In fact, during the malting processing, amylases were generated at the germination step of the sorghum grains which hydrolyse a part of the starch in reducing sugars (Traore et al. 2004). Finally, amylase activity of the strains is not important for the production of dolo and pito from malted sorghum. To our knowledge, a high prevalence of amylase-positive strains of *Lact. fermentum* has not been reported earlier. A very few strains of *Lact. fermentum* (Ogi E1, Mw2 and K9) isolated from African-fermented maize products have been reported as amylase producers (Agati et al. 1998; Sanni et al. 2002). In addition, a few strains of *Lact. plantarum*, *Lact. cellobiosus* and *Lact. manihotivorans* isolated from maize- and cassava-fermented products have also been identified as producing amylase (Giraud et al. 1993; Olasupo et al. 1996; Sanni et al. 2002; Morlon-Guyot et al. 1998). Kostinek et al. (2005) also did not find amylase-producing strains among the predominant LAB isolated from fermented cassava.

The other compounds provided by LAB during the fermentation of cereal-based foods are aroma compounds which also contribute to the taste and the flavour of the fermented products (Halm et al. 1993; Annan et al. 2003) and it may also apply for dolo and pito wort.

Finally, the major role of *Lact. fermentum* in the processing of dolo and pito is to ferment the wort by lower-

ing its pH for the subsequent yeast fermentation, and to provide organic acids, antimicrobial compounds and EPSs. For the selection of starter cultures, an antimicrobial activity, a rapid rate of acidification and EPSs production have to be considered, which include safety and processing aspects. For this, suitable strains have to be selected according to their useful technological properties. The use of starter cultures for a controlled fermentation of dolo and pito wort, should improve the processing by shortening its duration, and improve also the quality of the final products. As stated in the Introduction, it is important to note that the final wort is also drunk as nonalcoholic beverage by people and the development of such kind of product as food drink, by the use of selected starter cultures present more advantages for the packaging and the shelf-life of the product, as well as the safety assurance for the consumers.

### Acknowledgements

The present work has been sponsored by the Danish International Development Assistance, Danish Foreign Ministry (DANIDA) and the Government of Burkina Faso. The authors are thankful to Mamounata Congo and Sidonie Kolosnoré for technical assistance.

### References

- van der Aa Kühle, A., Jespersen, L., Glover, R.L.K., Diawara, B. and Jakobsen, M. (2001) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer. *Yeasts* **18**, 1069–1079.
- Agati, V., Guyot, J.P., Morlon-Guyot, J., Talamond, P. and Hounhouigan, D.J. (1998) Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize dough (mawè and ogi) from Benin. *J Appl Microbiol* **85**, 512–520.
- Annan, N.T., Poll, L., Sefa-Deddeh, S., Plahar, W.A. and Jakobsen, M. (2003) Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture maize dough. *J Appl Microbiol* **94**, 462–474.
- Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. and El-Soda, M. (2004) Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiol* **21**, 715–725.
- Bansah, D. (1990) *Traditional brewing of pito: process and product characteristics*. MPhil Thesis, University of Ghana, Legon, Ghana.
- van den Berg, D.J.C., Robijn, G.W., Janssen, A.C., Giuseppin, M.L.F., Vreeker, R., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Ledebor, A.M. et al. (1995) Production of a novel extracellular polysaccharides by *Lactobacillus sakei* 0-1 and

- characterization of the polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2840–2844.
- Calderon Santoyo, M., Loiseau, G., Rodriguez Sanoja, R. and Guyot, J.P. (2003) Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and  $\alpha$ -amylase production at pH 4.0. *Int J Food Microbiol* **80**, 77–87.
- Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **87**, 113–130.
- Davidson, P.M. (1997) Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers* ed. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. pp. 520–556. Washington, DC: ASM Press.
- De Man, J.C., Rogosa, R. and Sharpe, M.E. (1960) A medium for the cultivation of lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria* ed. Salminen, S. and von Wright, A. pp. 129–159. New York: Marcel Dekker.
- De Vuyst, L. and Degeest, B. (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 153–177.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (1994) Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of Lactic acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications* ed. De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. pp. 91–142. London: Blackie Academic and Professional.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F. and Degeest, B. (2001) Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J* **11**, 687–707.
- Demuyakor, B. and Ohta, Y. (1991) Characteristics of pito yeast from Ghana. *Food Microbiol* **8**, 183–193.
- FAO (1995) *Le sorgho et les mils dans la nutrition humaine: Alimentation et nutrition*, No. 27, Rome, Italy [ISBN 92-5-203381-5], available at: <http://www.fao.org/docrep/T0818F/T0818F01/htm> (last accessed 7 Nov 2006).
- Giraud, E., Gosselin, L., Marin, B., Parada, J.L. and Raimbault, M. (1993) Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *J Appl Bacteriol* **75**, 276–282.
- Giraud, E., Champailier, A. and Raimbault, M. (1994) Degradation of raw starch by wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 4319–4323.
- Glover, R.L.K., Abaidoo, R.C., Jakobsen, M. and Jespersen, L. (2005) Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from a survey of pito production sites in various parts of Ghana. *Syst Appl Microbiol* **28**, 755–761.
- Guiraud, J.P. (1998) *Microbiologie alimentaire*. pp. 292–293. Paris, France: Ed Dunod.
- Haggblade, S. and Holzapfel, W.H. (1989) Industrialization of Africa's indigenous beer brewing. In *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*, vol. 33 ed. Steinkraus, K.H. pp. 191–283. New York: Marcel/Dekker.
- Halm, M., Lillie, A., Sørensen, A.K. and Jakobsen, M. (1993) Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize dough for kenkey production in Ghana. *Int J Food Microbiol* **19**, 135–143.
- Hamad, S.H., Dieng, M.C., Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F. (1997) Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *J Appl Microbiol* **83**, 764–770.
- Hayford, A.E., Petersen, A., Vogensen, F.K. and Jakobsen, M. (1999) Use of conserved randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments and RADP pattern of characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian fermented maize dough. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3213–3221.
- Hounhouigan, D.J., Nout, M.J.R., Nago, C.M., Houben, J.H. and Rombouts, F.M. (1993a) Characterization and frequency distribution of lactic acid bacteria involved in the processing of mawè, a fermented maize dough from Benin. *Int J Food Microbiol* **18**, 279–287.
- Hounhouigan, D.J., Nout, M.J.R., Nago, C.M., Houben, J.H. and Rombouts, F.M. (1993b) Composition and microbiological and physical attributes of mawè, a fermented maize dough from Benin. *Int J Food Sci Technol* **28**, 513–517.
- Johansson, M.L., Sanni, A., Lonner, C. and Molin, G. (1995) Phenotypically based taxonomy using API 50 CH of lactobacilli from Nigeria Ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *Int J Food Microbiol* **25**, 159–168.
- Knoshaug, E.P., Ahlgrent, J.A. and Trempey, J.E. (2000) Growth associated exopolysaccharide expression in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* rOPY 352. *J Dairy Sci* **83**, 633.
- Konlani, S., Delgenes, J.P., Moletta, R., Traoré, A. and Doh, A. (1996) Isolation and physiological characterization of yeasts involved in sorghum beer production. *Food Biotechnol* **10**, 29–40.
- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W.H. and Franz, C.M.A.P. (2005) Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for preparation of Gari, a traditional African food. *Syst Appl Microbiol* **28**, 527–540.
- Lei, V. and Jakobsen, M. (2004) Microbiological characterization and probiotic potential of koko and koko sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *J Appl Microbiol* **96**, 384–397.
- Martensson, O., Duenas-Chasco, M., Irastorza, A.R.O. and Holst, O. (2003) Comparison of growth characteristics and exopolysaccharide formation of two lactic acid bacteria strains, *Pediococcus damnosus* 2.6 and *Lactobacillus brevis* G.77, in an oat-based, non-dairy medium. *Lebensmittel-Wiss Technol* **36**, 353–357.
- Mensah, P., Thomkins, A.M., Prasar, B.S. and Harrison, T.J. (1991) Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *J Appl Bacteriol* **70**, 203–210.
- Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P., Pot, B., Jacobe de Haut, I. and Raimbault, M. (1998) *Lactobacillus manihotivorans* sp.nov., a new starch-hydrolysing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 1101–1109.
- Olasupo, N.A., Olukoya, D.K. and Odunfa, S.A. (1996) Studies on local strains of amylolytic *Lactobacillus* from Nigerian fermented foods. *Int J Food Res Dev* **40**, 45–46.



- Olasupo, N.A., Olukoya, D.K. and Odunfa, S.A. (1997) Identification of *Lactobacillus* species associated with selected African fermented foods. *Verlag Z Naturforsch* **52c**, 105–108.
- Olsen, A., Halm, M. and Jakobsen, M. (1995) The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interaction during fermentation. *J Appl Bacteriol* **79**, 506–512.
- Ouoba, L.I.I., Diawara, B., Amoa-Awua, W.K., Traoré, A.S. and Moller, P.L. (2004) Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soumbala. *Int J Food Microbiol* **90**, 197–205.
- Ouwehand, A.C. (1998) Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2nd edn ed. Salminen, S. and von Wright, A. pp. 139–159. New York: Marcel Dekker Inc.
- Oyetayo, V.O., Adetuyi, F.C. and Akinyosoye, F.A. (2003) Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. *Afr J Biotechnol* **2**, 448–452.
- Pidoux, M., Marshal, V.M., Zanoni, P. and Brooker, B. (1990) Lactobacilli isolated from sugar kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. *J Appl Bacteriol* **69**, 311–320.
- Sanni, A.I. and Lonner, C. (1993) Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiol* **10**, 517–523.
- Sanni, A.I., Morlon-Guyot, J. and Guyot, J.P. (2002) New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lact. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *Int J Food Microbiol* **72**, 53–62.
- Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Bassole, I.H.N. and Traore, A.S. (2004) Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pak J Nutr* **3**, 174–179.
- Sawadogo-Lingani, H., Lei, V., Diawara, B., Nielsen, D.S., Møller, P.L., Traoré, A.S. and Jakobsen, M. (2007) The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort, for production of sorghum beer. *J Appl Microbiol* **103**, 765–777.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* **55**, 1901–1906.
- Sikkema, J. and Oba, T. (1998) Extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria. *Snow Brand R&D Rep*, **107**, 1–31.
- Simango, C. and Rukure, H. (1992) Survival of bacterial enteric pathogens in traditional fermented foods. *J Appl Bacteriol* **73**, 37–40.
- Sulma, I., Larry, R.S. and Kirleris, A. (1991) Isolation and characterization of microorganisms associated with production of Sudanese *kirsa*. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2529–2533.
- Sutherland, I.W. (1977) Bacterial exopolysaccharides, their nature and production. In *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic cell* ed. Sutherland, I.W. pp. 27–96. London: Academic Press.
- Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci, M.C. (2003) Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res Microbiol* **154**, 705–712.
- Traore, T., Mouquet, C., Icard-Vernière, C., Traore, A.S. and Trèche, S. (2004) Changes in nutrient composition, phytate and cyanide contents and  $\alpha$  amylase activity during cereal malting in small production units in Ouagadougou (Burkina Faso). *Food Chem* **88**, 105–114.
- Yan, T.R. and Lee, C.S. (1997) Characterization of partially purified bacteriocin, Fermentcin B, from *Lactobacillus fermentum*. *Biotechnol Lett* **19**, 741–744.
- Yao, A.K., Kadio, G., Coulybaly, A. and Agbo, G.Z. (1995) Production du “Tchapalo” à partir du sorgho en Côte d’Ivoire. In *Processing and Industrial Utilization of Sorghum and Related Cereals in Africa. Proceeding of the OUA/STRC-SAFGRAD Regional Symposium* ed. Menyonga, J.M., Bezuneh, T., Nwasike, C.C., Sedogo, P.M. and Tenkouano, A. Ouagadougou, Burkina Faso, 22–26 November 1993., pp. 55–60. Ouagadougou, Burkina Faso: OUA/STRC-SAFGRAD, Agence Internationale de Communication pour le Développement.

Full Length Research Paper

# Predominant lactic acid bacteria associated with the traditional malting of sorghum grains

H. Sawadogo-Lingani<sup>1\*</sup>, B. Diawara<sup>1</sup>, R. K. Glover<sup>2</sup>, K. Tano-Debrah<sup>3</sup>, A. S. Traoré<sup>4</sup> and M. Jakobsen<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Département Technologie Alimentaire (DTA) / IRSAT / CNRST, Ouagadougou 03 BP 7047, Burkina Faso.

<sup>2</sup>Department of Applied Biology, Faculty of Applied Sciences, University for Development Studies P. O. Box 24, Navrongo, Ghana.

<sup>3</sup>Department of Nutrition and Food Science, University of Ghana, P. O. Box LG134, Legon-Accra, Ghana.

<sup>4</sup>Université de Ouagadougou / UFR – SVT / CRSBAN, Ouagadougou 03 BP 7131, Burkina Faso.

<sup>5</sup>Department of Food Science Food Microbiology, University of Copenhagen, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C Denmark.

Accepted 5 November, 2009

The traditional processes of sorghum grains malting were investigated in Tamale (Northern Ghana) from the raw materials through to the sun-dried malted sorghum including steeping and germination stages. Samples were taken at each processing stage and cultured for the isolation of LAB. The isolates were characterized by basic phenotyping, ITS-PCR / RFLP analysis and identified by partial sequencing of 16S r RNA genes. Their antimicrobial and amyolytic activities and exopolysaccharides production were also investigated. During steeping, the LAB counts in the steep water increased from  $10^5$  to  $10^9$  -  $10^{10}$  cfu/ml and pH of the steep water decreased from  $5.08 \pm 0.22$  to  $4.20 \pm 0.50$ . A total of 106 isolates were identified and the predominant isolates belonged to the species *Lactobacillus fermentum* (58.49%), *Pediococcus acidilactici* (22.64%), *Weissella confusa* (11.32%), *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaseus* and *Lactococcus lactis*. Some isolates showed interesting antimicrobial activity (39.62%), slight amyolytic activity (37.73%) and ability to produce exopolysaccharides (90.5%). *L. fermentum* isolates dominated the microbiota from sorghum grains to malted sorghum. These isolates had technological properties comparable to those responsible for the acidification of sorghum beer (dolo, pito) wort produced from sorghum malt (previously studied), suggesting their potential for use as starter cultures. Suitable isolates of *L. fermentum* are promising candidates to be used as starter cultures from the initial step of malting, that is, the steeping and are expected to inhibit the growth and survival of pathogens and spoilage microflora, and to control the lactic fermentation of dolo and pito wort or other sorghum malt-based products like infant formulations.

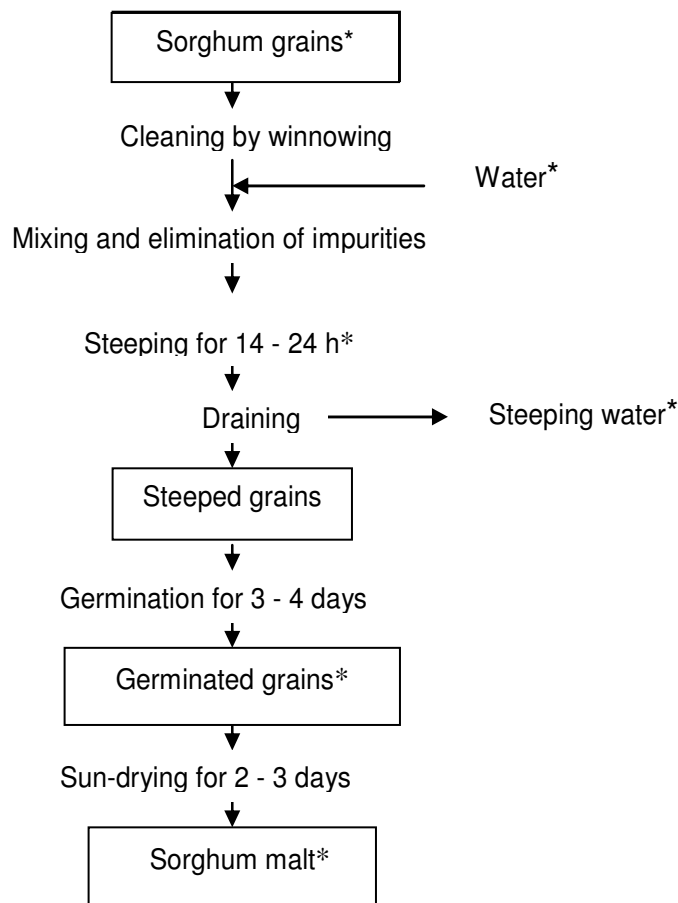
**Key words:** Sorghum, sorghum malt, lactic acid bacteria, identification, technological properties.

## INTRODUCTION

Malted cereal grains are used as food ingredients for example in the preparation of weaning foods to improve the nutritional quality and increase the energy density of cereals-based gruels; this occurs by liquefying the cereals by the action of the amylases present in the malt (Mallehi et al., 1989; Onyeka and Dibia, 2002; Mbofung and Fombang, 2004; Traoré et al., 2004). Sorghum malt

is specifically used to brew traditional opaque beers in many countries in Africa, such as Bantu beer in South Africa, bili-bili in Tchad and North Cameroon, Burukutu or choukoutou in Benin and North Nigeria, Chibuku in Zimbabwe, dolo in Burkina Faso and Mali, pito in Ghana, Togo and Nigeria, tchapalo in Côte d'Ivoire. The production of these traditional beers starts with the malting of the sorghum. Malted sorghum is also used for the production of non-alcoholic fermented beverages in Nigeria, e.g. otika (Chinyere and Onyekwere, 1996) and fermented sorghum malt-based food in Benin, e.g. gowé (Vieira-Dalodé et al., 2007).

\*Corresponding author. E-mail: [hagretou@yahoo.fr](mailto:hagretou@yahoo.fr). Tel: 00 226 50 36 37 90 / 00 226 76 63 98 90. Fax: 00 226 50 35 70 29.



**Figure 1.** General flow diagram of traditional malting of sorghum grains at the two production sites in Tamale. \*: sampling steps.

Malting is the limited germination of cereal grains with the objective to generate the endogenous hydrolytic enzymes (amylases, maltases, proteases ...) which break down starch and proteins to provide fermentable sugars, free nitrogen and free amino acids. The malting process also provides aroma and other compounds essential for the fermentation and the sensory quality of the beer and modifies the structure of the grain so that it will be readily solubilised during the brewing process to produce the fermentable wort (Demuyakor and Ohta, 1992; Dewar et al., 1997; Agu and Palmer, 1996). The traditional malting process of sorghum grains (Figure 1) in Tamale (Northern Ghana) lasts for 6 to 8 days and involves three main steps: Steeping of grains in water, germination and sun drying of the germinated grains. Steeping is the immersion of grains in water over a period of time and sorghum grains should attain a moisture content of 33 - 36% during the steeping (Agu and Palmer, 1998).

It is a critical stage at which grain microorganisms start to proliferate due to the favourable moisture content (Noots et al., 1999). The bacteria, yeast and moulds

which proliferate during the steeping continue to develop during the germination stage (Agu and Palmer, 1997). Some of these survive through the drying step and contribute to the brewing process. Other could cause spoilage and even poisoning if their presence is not controlled (Priest and Campbell, 1996).

A diversity of moulds such as *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp, *Rhizopus*, *Phoma* spp., *Alternaria* spp., *Mucor* spp. (Ogundiwin et al., 1991; Lefyedi, 2006) and bacteria including *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina* spp. and *Lactobacillus* spp. (Ilori et al., 1991; Ogundiwin et al., 1991) have been identified as microorganisms associated with sorghum grains and malt.

As in the case of barley, chemical treatments using formaldehyde, sorbic acid, sodium benzoate, sodium and calcium chlorite... have been investigated to inhibit the growth of microorganisms during malting of sorghum (Ogundiwin et al., 1991; Lefyedi, 2006). Biological methods involving inoculation with lactic acid bacteria (LAB) and yeast starter cultures in the steep water have been shown promising for the control of undesirable bacteria and moulds during barley and sorghum malting (Boivin and Malanda, 1997; Lefyedi, 2006). LAB are well known to be able to inhibit the growth and survival of spoilage microflora and pathogens (Holzapfel et al., 1995). Booyesen et al. (2002) identified species of *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* and *Lactococcus* during the malting of barley.

Antimicrobial-producing LAB species belonging to *Enterococcus* spp and *Lactococcus* spp have been detected from raw barley and sorghum (Hartnett et al., 2002). *L. fermentum* was found to be present in a significant number but not dominant during the spontaneous fermentation of ogi and kunun-zaki, fermented sorghum or millet-based products (Olasupo et al., 1997).

Studies on the microbiology of sorghum malting are scarce. In our previous investigation, the predominant LAB involved in the processes of dolo and pito were identified and *L. fermentum* was found to be dominant in the malted sorghum used as raw material, during the mashing and the natural acidification of the wort (Sawadogo-Lingani et al., 2007). Most of *L. fermentum* isolates were also found to be capable of producing exopolysaccharides (EPSs). Interesting antimicrobial activity was detected for some of them and a few isolates showed a slight amylolytic activity (Sawadogo-Lingani et al., 2008).

The aim of the present investigation was to identify the predominant LAB associated with the malting of sorghum grains and to compare their technological properties with those of LAB species involved in the natural fermentation of dolo and pito wort. The purpose is to identify suitable LAB strains that could be used as starter cultures from the initial step of the malting process of sorghum grains

(that is, the steeping) through to the acidification of the wort, to improve the safety of the malt in this process and also in other sorghum malt-based product processes.

## MATERIALS AND METHODS

### Traditional malting sites investigated and sampling

The malting process was investigated at two different sites in Tamale (Northern Ghana). The processes were carried out by two Dagarti women, one at Tamale town and the other at Nyankpala village. These women produce the malted sorghum to brew *pito*. The malting process by the Dagarti was called the Dagarti process.

The sorghum grains raw material at the sites studied were purchased at local markets. For the Dagarti process, a mixture of red and white sorghum grains (1:1) was used for the malting. Sampling was done twice on two different occasions at each production site at the main steps of the flow diagram shown in Figure 1. For each sampling, two samples of 200 g or 200 ml were taken aseptically into sterilized screw-cap bottles, kept in an icebox and taken to the laboratory where samples were stored at 4°C until analyzed. Analyses were performed within 24 h.

### Microbiological analyses, isolation and preliminary phenotypic characterization of LAB isolates

Microbial counts of the samples were carried out at the DANIDA laboratory, University for Development Studies at Tamale (Ghana), as previously described (Sawadogo-Lingani et al., 2007). Basic phenotypic characterization of the isolates was carried out at DTA / IRSAT / CNRST laboratory at Ouagadougou (Burkina Faso). For isolation of aerobic mesophilic bacteria, 10 colonies were randomly chosen from the highest dilution PCA plate of each sample and were purified by continued streaking onto PCA. For lactic acid bacteria, 15 colonies were randomly chosen from the highest dilution MRS plate of each sample and were purified by continued streaking onto MRS agar under anaerobic conditions using anaerobic jar and anaerocult A (Merck).

All pure isolates were characterized by colony morphology, cell morphology using phase contrast microscopy, Gram reaction by the KOH method (Gregersen, 1978), and catalase reaction by the 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> method (Barrow and Feltham, 1993). In addition, the production of gas by LAB isolates using the semi-solid medium of Gibson and Abd-el-Malek (Guiraud, 1998) and their ability to grow in MRS broth at 15° and 45°C, in MRS broth at pH 9.2 and in MRS broth with 6.5% NaCl, were also tested. A total of 106 LAB isolates obtained from the malting sites in Tamale were subcultured and stored at -80°C in MRS broth with 50% (v/v) glycerol for their identification.

### Identification of LAB isolates

Isolates were cultured anaerobically on MRS agar for 48 h as described above and then in MRS broth at 37°C for 24 h before use. All of the 106 isolates obtained from Tamale, from samples collected in the main steps of the malting process (Figure 1), were initially grouped by Intergenic Transcribed Spacers-Polymerase Chain Reaction / Restriction Fragment Length Polymorphism (ITS-PCR / RFLP) analysis according to the method previously described (Sawadogo-Lingani et al., 2007). Thirty Two (32) isolates representing all the ITS-PCR / RFLP groups were randomly chosen and tentatively identified by API 50 CHL strips (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France) using APILAB Plus version 3.3.3 (BioMerieux). The identities of the isolates were confirmed by partial sequencing of the 16S r RNA gene. The sequencing was carried out with isolates

representing all the ITS-PCR / RFLP groups and performed according to the method, reagents and equipments described by Lei and Jakobsen (2004); the template DNA was extracted and amplified as described in a previous investigation (Sawadogo-Lingani et al., 2007). The sequence of the r RNA genes and the identities of the isolates were obtained by BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The partial 16S sequences were submitted to EMBL Nucleotide Sequence Database and given the accession numbers FM163355, FM163356, FM163357 and FM164796 for *L. fermentum* strains N3a6, N3a9, Nsb2 and Nsb8, FM163353 and FM163354 for *Ped. acidilactici* strains Npo8 and N1a5, FM163360 for *P. pentosaceus* strain N2a17, FM163358 and FM163359 for *W. confusa* N1a4 and N2a8, FM163361 for *Lactococcus lactis* strain N2a2, FM163362 for *Enterococcus faecium* strain N2a18a.

### Determination of the technological properties of isolates

The 106 Tamale isolates were screened for their antimicrobial activity, amylase production and exopolysaccharides (EPSs) production according to the methods, reagents and media previously described (Sawadogo-Lingani et al., 2008). For the antimicrobial activity, *Listeria innocua* ATTC 33090, *S. aureus* enterotoxin A producer, *S. aureus* enterotoxin A and B producer, and *E. coli* P1 Etec obtained from Department of Food Science, Food Microbiology at University of Copenhagen, were used as indicator microorganisms. For their ability to produce amylase, isolates were grown on modified MRS media with starch as only source of carbon (MRS-starch agar) under anaerobic conditions, and the culture on MRS-starch agar were sprayed with Lugol's iodine [0.33% (w/v) iodine (Prolabo, Paris, France), 0.66% (w/v) potassium iodide (Labosi, Paris, France)] to detect starch hydrolysis. The ability of the isolates to grow on MRS-starch agar was also recorded.

For EPSs production, isolates producing EPSs were first selected on the basis of the stickiness of the colonies grown on specific media and confirmed by growing them for 24 h at 30°C in MRS-sucrose (5% w/v) broth without glucose and peptone, pH 5.0 ± 0.2. A volume of 1.5 ml of the 24 h culture was centrifuged at 5 000 g for 10 min (4°C) and 1 ml of the supernatant was put in a glass tube and an equal volume of ethanol 95% was added. In the presence of EPSs, an opaque link was formed at the interface; the positive isolates were classified according to the intensity of the opaque link: ++ for good production; + for fair production; ± for poor production.

## RESULTS

### Characteristics and identities of the predominant lactic acid bacteria isolates

#### *Counts of dominant microorganisms during malting of sorghum grains*

For *Dagarti* malting process in Tamale, sorghum grains used as raw material at the production sites investigated contained LAB, aerobic mesophilic bacteria and yeasts at the levels of 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> and 10<sup>5</sup> cfu / g respectively (Table 1). During steeping of the grains, the pH of steep water decreased from 5.08 ± 0.22 to 4.20 ± 0.50 and growth of microorganisms was observed: the total LAB counts in the steep water increased from 10<sup>5</sup> to 10<sup>10</sup> cfu / ml, while total aerobic bacteria counts increased from 2.9 × 10<sup>7</sup> to 4.0 × 10<sup>7</sup> cfu / ml, and yeasts counts increased by about 1 log unit. The proliferation of aerobic bacteria seem to

**Table 1.** pH and dominant microorganism counts during the malting of sorghum grains at two production sites in Tamale (Northern Ghana).

Samples/Steps of production	pH	Lactic acid bacteria (LAB) (cfu / g or ml)			Aerobic mesophilic bacteria (cfu / g or ml)			Yeast (cfu / g or ml)
		Total LAB	Gram+cat – rods or coccoid rods	Gram+cat –tetrad forming cocci or cocci	Total aerobic mesophilic	Gram–cat+ motile rods	Gram+cat+ non-motile sporing rods	
Sorghum grains	nd	$(7.9 \pm 1.4)10^5$	$(5.8 \pm 0.9)10^5$	$(2.1 \pm 0.5)10^5$	$(4.4 \pm 1.1)10^6$	$(4.2 \pm 1.0)10^6$	$(1.3 \pm 0.4)10^5$	$(2.1 \pm 1.5)10^5$
Water used	$5.81 \pm 0.11$	$(4.1 \pm 1.1)10^4$	$(2.4 \pm 0.5)10^4$	$(1.7 \pm 0.6)10^4$	$(2.1 \pm 1.0)10^5$	$(1.7 \pm 1.0)10^5$	$(3.2 \pm 1.4)10^4$	$(2.8 \pm 1.3)10^3$
Water from beginning of steeping	$5.08 \pm 0.22$	$(7.8 \pm 2.5)10^5$	$(4.9 \pm 1.0)10^5$	$(2.9 \pm 1.5)10^5$	$(2.9 \pm 1.1)10^7$	$(2.8 \pm 1.0)10^7$	$(1.4 \pm 0.3)10^6$	$(3.8 \pm 2.2)10^4$
Water from end of steeping	$4.20 \pm 0.50$	$(4.2 \pm 1.7)10^{10}$	$(3.5 \pm 1.5)10^{10}$	$(6.7 \pm 2.2)10^9$	$(4.0 \pm 1.3)10^7$	$(3.5 \pm 1.1)10^7$	$(4.9 \pm 2.3)10^6$	$(5.5 \pm 2.3)10^5$
Soaked grains	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Germinated grains	nd	$(5.0 \pm 1.2)10^7$	$(4.3 \pm 1.0)10^7$	$(6.5 \pm 1.8)10^6$	$(5.3 \pm 2.3)10^6$	$(3.4 \pm 0.7)10^5$	$(4.9 \pm 2.3)10^6$	$(4.8 \pm 1.9)10^4$
Sun-dried sorghum malt	$5.42 \pm 0.02$	$(1.3 \pm 0.7)10^7$	$(1.3 \pm 0.7)10^7$	$(3.2 \pm 0.3)10^5$	$(7.1 \pm 1.0)10^6$	$(4.2 \pm 3.1)10^5$	$(6.7 \pm 1.6)10^6$	$(3.5 \pm 0.4)10^6$

\*: presence of moulds. nd: not determined.

be mainly due to the growth of Gram-positive catalase-positive bacteria than the growth of Gram-negative catalase-positive. The counts of the former increased about 3.5 fold, while the counts of the latter increased about 1.2 fold for the Dagarti process samples (Table 1).

Microbial levels of the water used for the steeping was around  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^3$  cfu / ml respectively for LAB, aerobic mesophilic bacteria and yeasts. Germinated grains and sun-dried sorghum malt contained high levels of LAB ( $10^7$  cfu / g); aerobic mesophilic bacteria ( $10^6$  cfu / g) and yeasts ( $10^4$  cfu / g and  $10^6$  cfu / g respectively). Moulds were observed in the raw sorghum, the steep water at beginning of steeping, the germinated grains and the sun-dried malted sorghum (Table 1). For all the samples of sun-dried malted sorghum analysed, LAB counts were higher than aerobic bacteria counts.

A total number of 106 Gram-positive catalase-negative, non-sporing and non motile rods, coccoid rods, cocci or tetrad forming cocci, were isolated from the production sites investigated. Most of these isolates (70%) were heterofermen-

tative bacteria producing gas from glucose.

#### **ITS-PCR / RFLP profiles of the isolates**

All the 106 Tamale isolates used for the genotyping were distributed in four ITS-PCR profiles namely A, B, H and I (Table 2). ITS-PCR profile A (46 isolates) was characterized by five bands of 756, 539, 473, 406 and 289 pb, while ITS-PCR profile B (16 isolates) was characterized by four bands of 756, 473, 406 and 289 pb. Profile H (26 isolates) presented three bands of 510, 439 and 315 pb, while profile I (12 isolates) presented 3 bands of 532, 448 and 335 pb. The remaining isolates showed profiles different from profiles A, B, H and I and were referred to profile O (Table 2).

After digestion with the restriction endonuclease *Taq*<sup>o</sup>I, the isolates clustered in the ITS-PCR profile A gave the RFLP profile a with five bands (387, 332, 210, 134 and 98 pb) or c with four bands (332, 210, 134 and 98 pb). The isolates of ITS-PCR profile B presented RFLP

profile a or profile d with three bands of 210, 134 and 98 pb. These results highlight a similarity between the isolates of profiles A and B. Isolates of ITS-PCR profile H showed RFLP profile h with bands of 404, 320, 249, 194 and 91 bp, and the isolates clustered in the profile ITS-PCR I showed the RFLP profile i with bands of 334, 262, 194, 138 and 77 pb (Table 2).

#### **Identities of the predominant LAB species**

For the identification, thirty (30) isolates representing all the ITS-PCR / RFLP groups were tentatively identified by API 50 CHL/APILAB Plus Version 3.3.3 strips and their identities were confirmed by sequencing of the 16S r RNA genes. Thus, the isolates of ITS-PCR / RFLP profiles A/a, A/c and B/a were tentatively identified by API 50 CHL strips as *Lactobacillus brevis*, and those of profile B/d were identified as *Lactobacillus cellobiosus*. The isolates of ITS-PCR / RFLP profile H/h were identified as *Pediococcus pentosaceus*, while those of profile I/i were inden-

**Table 2.** ITS-PCR/RFLP products of the 106 isolates of lactic acid bacteria associated with the malting of sorghum at the production sites of Nyankpala and Tamale town

Profiles	ITS-PCR products		RFLP products		Number of isolates		
	Profiles	Sizes of bands (fragments) in bp	Profiles	Sizes of bands (fragments) in bp	Total	Nyankpala	Tamale town
A (5 bands)		756 ± 25; 539 ± 14; 473 ± 13; 406 ± 11; 289 ± 8	a (28 isolates) c (18 isolates)	387 ± 21; 332 ± 10; 210 ± 11; 134 ± 10; 98 ± 11 332 ± 10; 210 ± 11; 134 ± 10; 98 ± 11	46	24	22
B (4 bands)		756 ± 25; 473 ± 13; 406 ± 11; 289 ± 8	a (12 isolates) d (4 isolates)	387 ± 21; 332 ± 10; 210 ± 11; 134 ± 10; 98 ± 11 210 ± 11; 134 ± 10; 98 ± 11	16	10	6
H (3 bands)		510 ± 11; 439 ± 9; 315 ± 8	h	404 ± 11; 320 ± 9; 249 ± 9; 194 ± 6; 91 ± 12	26	12	14
I (3 bands)		532 ± 11, 448 ± 9; 335 ± 10	i	334 ± 18; 262 ± 19; 194 ± 10; 138 ± 11; 77 ± 8	12	7	5
O (other)		nd	nd	nd	6	4	2

nd: not determined.

**Table 3.** Identification of the 106 isolates of lactic acid bacteria associated with the malting of sorghum at the production sites of Nyankpala and Tamale town.

ITS-PCR/RFLP profiles	API CHL presumptive identification	16S r genes sequencing			% of isolates
		Identities	% of similarity	Accession number	
A/a	<i>L. brevis</i> with 99.9%ID (7 isolates)*	<i>L. fermentum</i> (N3a6) **	99.5	FM163355	58.49
A/c	<i>L. brevis</i> with 95.5%ID (5 isolates)	<i>L. fermentum</i> (N3a9)	99.0	FM163356	
B/a	<i>L. brevis</i> with 99.6%ID (5 isolates)	<i>L. fermentum</i> (Nsb2)	99.0	FM163357	
B/d	<i>L. cellobiosus</i> with 96 %ID (2 isolates)	<i>L. fermentum</i> (Nsb8)	99.2	FM164796	
H/i	<i>P. pentosaceus</i> with 98%ID (6 isolates)	<i>P. acidilactici</i> (N1a5)	99.3	FM163354	22.64
		<i>P. acidilactici</i> (Npo8)	99.0	FM163353	
		<i>P. pentosaceus</i> (N2a17)	99.5	FM163360	1.88
I/i	<i>L. coprophilus</i> with 98.8%ID (4 isolates)	<i>W. confusa</i> (N1a4)	99.7	FM163358	11.32
		<i>W. confusa</i> (N2a8)	99.7	FM163359	
O	<i>L. acidophilus</i> with 89.5%ID (1 isolates) <i>Lactococcus lactis</i> with 58.3% ID (2 isolates)	<i>Lactococcus. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (N2a2)	95.7	FM163361	1.88
		<i>Enterococcus faecium</i> (N2a18a)	99.5	FM163362	3.77

\*: in brackets, number of isolates used for API CHL identification; \*\*: in brackets, reference of isolates used for sequencing.

identified as *L. coprophilus* (Table 3). The partial sequencing of the 16S r RNA genes (region 968-1401) of the isolates representing ITS-PCR / RFLP profiles showed that all the isolates clus-

tered in ITS-PCR / RFLP profiles A/a, A/c, B/a and B/d were related to *L. fermentum* at 99.5, 99.2 and 99.0% similarity (Table 3); their cells were rod-shaped, producing gas from glucose, growing

at 45°C but more and less at 15°C (result not shown).

The isolates of ITS-PCR / RFLP profile H/h were related to *Pediococcus acidilactici* at 99.3

**Table 4.** Distribution (in % of isolates collected from the sample) of predominant LAB species during the malting of sorghum at the production sites of Nyankpala (N) and Tamale town (Tt); in brackets, counts in cfu / g or ml.

Samples/ steps of production	Nyankpala production site					
	<i>L. fermentum</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>W. confusa</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>E. faecium</i>
Sorghum grains	56.2(4.4 x10 <sup>5</sup> )	18.7(1.5 x10 <sup>5</sup> )	-	18.7(1.5 x10 <sup>5</sup> )	-	6.2(4.9 x10 <sup>4</sup> )
Water from beginning of steeping	55.5(4.3 x10 <sup>5</sup> )	11.1(8.6 x10 <sup>4</sup> )	5.5(4.3 x10 <sup>4</sup> )	16.2(1.3 x10 <sup>5</sup> )	5.5(4.3 x10 <sup>4</sup> )	5.5(4.3 x10 <sup>4</sup> )
Water from end of steeping	66.7(2.8 x10 <sup>10</sup> )	25.0(8.2 10 <sup>9</sup> )	-	8.3(3.5 x10 <sup>9</sup> )	-	-
Sun dried sorghum malt	70.0(9.1 x10 <sup>6</sup> )	30.0(3.9 x10 <sup>6</sup> )	-	-	-	-
<b>Tamale town production site</b>						
Sorghum grains	42.8(3.4 x10 <sup>5</sup> )	28.6(2.2 x10 <sup>5</sup> )	7.1(5.6 x10 <sup>4</sup> )	14.3(1.1 x10 <sup>5</sup> )	-	7.1(5.6 x10 <sup>4</sup> )
Water from beginning of steeping	54.5(4.2 x10 <sup>5</sup> )	27.3(2.1 x10 <sup>5</sup> )	-	9.1(7.1 x10 <sup>4</sup> )	9.1(7.1 x10 <sup>4</sup> )	-
Water from end of steeping	61.5(2.6x10 <sup>10</sup> )	23.1(9.6 x10 <sup>9</sup> )	-	15.4(6.4 x10 <sup>9</sup> )	-	-
Sun-dried sorghum malt	66.7(8.6 x10 <sup>6</sup> )	25.0(3.2 x10 <sup>6</sup> )	-	-	-	8.3(1.1 x10 <sup>6</sup> )

-.: not found in the isolates.

and 99.0% similarity; two of them were related to *P. pentosaceus* at 99.5% similarity (Table 3); the cells were tetrad forming cocci, not producing gas from glucose, growing at 15°C and 45°C (result not shown). The isolates clustered in ITS-PCR / RFLP profile I/i were related to *Weissella confusa* at 99.7% similarity (Table 3) and their cells were coccoid rods, single, in pair and short chains (3 - 4 cells); they produced gas from glucose and grew at 15°C and 45°C (result not shown). The remaining isolates were identified by the sequencing as *E. faecium* at 99.5% similarity (4 isolates) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* at 95.7% similarity (2 isolates) (Table 3).

The isolates of *E. faecium* were cocci in pairs and short chains, not producing gas from glucose, growing at 15°C and 45°C, growing in MRS broth with 6.5% NaCl and MRS broth at pH 9.2; the isolates of *Lactococcus lactis* were ovoid cells in pairs and chains, not producing gas from glucose, growing at 15°C but not at 45°C, growing in MRS broth at pH 9.2 but not in MRS broth with

6.5% NaCl. Predominant LAB species associated with the traditional malting of sorghum grains in Tamale (Northern Ghana) for the production of pito, a sorghum beer, belonged to the species *L. fermentum* (58.49% of the isolates), *P. acidilactici* (22.64%), *P. pentosaceus* (1.88%), *W. confusa* (11.32%), *E. faecium* (3.77%) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (1.88%).

#### **Distribution of LAB species by steps and production sites**

As it can be seen from Table 4, throughout the malting process in Tamale town (Tt) and Nyankpala (N) production sites, *L. fermentum* was the predominant species in the raw sorghum grains (42.8 - 56.2% of the isolates collected from this step), from the beginning (54.5 - 55.5% of the isolates) to the end (61.5 - 66.7% of the isolates) of steeping of grains in water and in the sun-dried sorghum malt (66.7 - 70% of the isolates). *P.*

*acidilactici* represented the second predominant species which has been identified for 11.1 to 30.0% of the isolates according to the step. *W. confusa* was also one of the predominant species found in the raw sorghum grains (14.3 - 18.7% of the isolates from this step), from the beginning (9.1 - 16.2%) to the end (8.3 - 15.4%) of the steeping of grains, but this species was not detected in the sun-dried sorghum malt (Table 4). At both production sites, *L. fermentum*, *P. acidilactici* and *W. confusa* were involved in the spontaneous lactic fermentation which occurred during the steeping of grains in water and their counts in the steep water increased from 10<sup>4</sup> - 10<sup>5</sup> to 10<sup>9</sup> - 10<sup>10</sup> cfu / ml (Table 4). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *E. faecium* were found at a minor level sometimes in the raw grains, the water from the beginning of steeping or the sun dried sorghum malt (Table 4). These results showed that the main origin of *L. fermentum* and *P. acidilactici* found in the malted sorghum was the raw sorghum grains.

## Technological properties of the LAB isolates

### **Carbohydrates fermentation patterns (API 50 CHL) of LAB species identified**

The isolates of *L. fermentum*, *P. acidilactici* and *W. confusa* were capable of fermenting galactose, D-glucose, D-fructose and D-mannose, but did not ferment starch.

In addition, *L. fermentum* isolates were able to ferment L-arabinose, ribose, melibiose, saccharose and gluconate. Maltose, D-raffinose and 5-ketogluconate were fermented by 94% of them, while 88% fermented D-xylose and 70% fermented lactose. Cellobiose, esculin, trehalose,  $\beta$ -gentiobiose, salicin and amygdalin were fermented L-arabinose, ribose, rhamnose, cellobiose, meli- by 47% of *L. fermentum* isolates; some of them fermented arbutin (39%), tagatose (35%) and mannitol (12%).

*P. acidilactici* isolates were also capable of fermenting cellobiose,  $\beta$ -gentiobiose and tagatose. 80% of them fermented ribose, trehalose and L-arabinose. Gluconate and mannitol were fermented by 40 and 20% were capable of fermenting glycerol, maltose, lactose and saccharose. *P. pentosaceus* isolates were able to ferment the carbohydrates fermented by *P. acidilactici* isolates except for mannitol and glycerol; in addition, they fermented D-xylose, melibiose, D-raffinose and starch.

*W. confusa* isolates were able to ferment ribose, D-xylose, cellobiose, maltose, melibiose, saccharose,  $\beta$ -gentiobiose and gluconate; 50% of them fermented L-arabinose, lactose, trehalose and raffinose.

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates fermented galactose, glucose, fructose, D-mannose, esculin, maltose, lactose and saccharose, while the isolates of *E. faecium* in addition to these sugars, fermented biose, trehalose, starch and  $\beta$ -gentiobiose (results not shown).

### **Antimicrobial activity of LAB isolates**

The 106 Tamale isolates were screened by the agar spot technique and antimicrobial activity was detected for 39.62, 22.64 and 17.92% of the isolates toward *S. aureus*, *E. coli* and *Listeria innocua* respectively; the sizes of the inhibition zones ranged between 6 and 20 mm for *S. aureus* and between 1 and 5 mm for *E. coli* and *L. innocua*. A total of 42 isolates exerted antagonism against *S. aureus*, and were composed of 35 *Listeria fermentum* isolates, six *W. confusa* isolates and one *P. pentosaceus* isolate; no isolate of *W. confusa* and *Pediococcus* spp. Showed antagonism against *E. coli* and *Listeria innocua* (Table 5). A total of 17.92% of the isolates tested exerted antagonism against all of the four indicator strains with sizes of inhibition zones ranging from 1 to 20 mm (result not shown). No isolate of *P. acidilactici*, *Lactococcus lactis* and *E. faecium* showed an antimicrobial activity against the four indicator strains

used.

### **Amylase production by LAB isolates**

A total of 40 of the 106 isolates screened, that is, 37.73% were capable of growing on modified MRS agar with starch as only source of carbon; these isolates were composed of 34 *L. fermentum* isolates, two *P. acidilactici* isolates, one *P. pentosaceus* isolate, two *W. confusa* isolates and one *E. faecium* isolate (result not shown). Even though a clear zone surrounding the tested colony had not been observed compared with the positive control strain which showed a clear zone of 2 mm, the growth on MRS-starch agar demonstrates a slight amylolytic activity of these isolates.

### **The ability of the isolates to produce Exopolysaccharides (EPSs)**

The screening of the 106 isolates for EPSs production under the experimental conditions described above revealed that most of them (90.5%) have the capacity to produce EPSs. A total of 82 isolates (77.3%) produced fairly EPSs and belonged to the species *L. fermentum* (59 isolates), *P. acidilactici* (13 isolates), *W. confusa* (6 isolates), *P. pentosaceus* (2 isolates) and *Lactococcus lactis* (2 isolates). Fourteen isolates (13.2%) which produced EPSs poorly belonged to the species *L. fermentum* (3 isolates), *P. acidilactici* (7 isolates) and *W. confusa* (4 isolates) (results not shown).

## DISCUSSION

At the two production sites studied, sorghum malt was produced at household level with rudimentary equipments and under uncontrolled environmental conditions. The increase in LAB counts and decrease in pH observed during the steeping of sorghum grains in water, have also been reported in previous studies conducted on steeping of cereals grains for malting or processing of fermented products (Odunfa and Adeyele, 1985; Booysen et al., 2002; Lei and Jakobsen, 2004). During barley malting for example, it has been reported that the hydration of barley kernels and the secretion of nutrients from kernels into the water, lead to the proliferation of various microorganisms including lactic acid bacteria (Kelly and Briggs, 1992); this is well known as the steeping process and it may also apply for sorghum grains.

The predominance of LAB in the sun-dried sorghum malt is due to the fact that these bacteria, already present in significant numbers in the raw sorghum grains, occurred in a high number during the steeping step which gives an advantage for their dominance in the sun-dried sorghum malt. When observing the succession of the main groups of microorganisms from the raw grains to



**Table 5.** Antimicrobial activity of the 106 LAB isolates toward pathogen indicator strains.

Pathogen indicator strains	Inhibitory spectrum of LAB isolates (n = 106)					Percentage (%) of isolates exhibiting antimicrobial activity
	<i>L. fermentum</i>	<i>W. confusa</i>	<i>Pediococcus</i> spp.	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>S. aureus</i> Enterotoxin A producer	-(27)	-(6)	-(25)	-(2)	-(4)	39.62% (42/106)
	++(12)	+++ (3)	+++ (1)			
	+++ (14)	++++ (3)				
	++++ (9)					
<i>S. aureus</i> Enterotoxin A+B producer	-(27)	-(6)	-(25)	-(2)	-(4)	39.62% (42/106)
	++(18)	+++ (6)	+++ (1)			
	+++ (12)					
	++++ (5)					
<i>E. coli</i> P1 Etec	-(38)	-(12)	-(26)	-(2)	-(4)	22.64% (24/106)
	+(24)					
<i>Listeria ... innocua</i> ATTC 33090	-(43)	-(12)	-(26)	-(2)	-(4)	17.92% (19/106)
	+(19)					

-: no activity; +: antimicrobial activity with inhibition zone of 1 to 5 mm; ++: antimicrobial activity with inhibition zone of 6 to 10 mm; +++: antimicrobial activity with inhibition zone of 11 to 15 mm; ++++: zone antimicrobial activity with inhibition zone of 16 to 20 mm, in brackets: number of isolates.

the sun-dried sorghum malt, it should be mentioned that the fermenting bacteria, that is, LAB, originated mainly from the raw sorghum grains, even though the environment, utensils and material such as the steeping vessel and the water used could also provide microorganisms. Based on that, Chavan and Kadam (1989) reported that the bacteria responsible for the natural fermentation of cereals were essentially the surface flora of seeds and this may also apply to sorghum grains.

Species of *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Pediococcus* seem to be predominant LAB associated with the steeping step of cereals grains. During the steeping of sorghum grains for ogibada production, a fermented gruel, the microbial population was mainly constituted by bacterial and yeasts, among which *Lactobacillus* spp. and

*Streptococcus* spp. occurred from  $10^6$  to  $10^9$  after 72 h of steeping (Odufa and Adeyele, 1985). Lei and Jakobsen (2004) also showed a decrease in pH from 6.0 to 4.3 and increase in LAB counts up to  $10^8$  cfu / ml during overnight steeping of millet for koko production in the Tamale region, in which *L. fermentum*, *W. confusa* and *L. salivarius* were found as predominating species associated with the steeping step.

Furthermore, in the case of barley malting, LAB counts in barley before steeping and during steeping, increased from  $10^3$  -  $10^4$  to  $10^7$  cfu / g, and *Leuconostoc argentinum*, *Leuconostoc lactis*, *W. confusa*, *L. casei* and *Lactococcus lactis* were found to be the most predominant species in kilned malt (Booyesen et al., 2002). For sorghum, *Lactobacillus* spp. and other bacteria have been identified in raw grains and malted sorghum (Ilori et al., 1991; Ogundiwin et al., 1991). In an early

study, Vieira-Dalodé et al. (2007) showed that *L. fermentum*, *W. confusa* and *P. acidilactici* constituted the dominant LAB species involved with yeasts in *gowé* fermentation, a fermented sorghum malt-based food from Benin. Previously, it has been shown that *L. fermentum* was the dominant species involved in the processing of dolo and pito, from the sorghum malt to the spontaneously fermented wort. *L. delbrueckii*, *P. acidilactici* and *Lactococcus lactis* were also identified but constituted a minor fraction of LAB population (Sawadogo-Lingani et al., 2007).

When comparing the sugar fermentation patterns of *L. fermentum* isolates with those involved in our previous study, a great similarity was observed despite the fact that additional sugars e.g. mannitol, D-tagatose, arbutin and salicin were fermented by 12 to 47% of the isolates involved in sorghum malting. *L. fermentum* has though been

described as positive (> 90%) for ribose, galactose, glucose, fructose, maltose, melibiose, saccharose and raffinose, and negative (< 10%) for esculin, melezitose, amygdalin, mannitol, rhamnose and sorbitol (Hammes et al., 1992; Seseña et al., 2004). Sugar fermentation profiles of the isolates identified as *P. acidilactici* are comparable to those of the isolates involved in *dolo* and *pito* wort processing (Sawadogo-Lingani et al., 2007) and also those reported by Simpson and Taguchi (1995). However some isolates showed the ability to ferment more sugars e.g. N-acetyl-glucosamine, maltose and gluconate. *W. confusa* has been described as positive (> 90%) for cellobiose, galactose, maltose, ribose, saccharose, xylose and esculin, and negative (< 10%) for L-arabinose, melibiose, raffinose and trehalose (Euzéby, 2004); all of our isolates showed the ability to ferment melibiose and 50% of them fermented arabinose, raffinose and trehalose. Most of the predominant cultures isolated in this study, showed an ability to ferment various carbohydrates which is an important technological trait for the lactic fermentation of food products.

Such as in our previous investigation, these results demonstrate a diversity of LAB isolates within species with regard to their ability of fermenting carbohydrates. Lei and Jakobsen (2004) also demonstrated a considerable biodiversity within the LAB strains isolated from koko through Principal Component Analysis (PCA) of their API profiles. The present investigation highlighted a discrepancy between API 50 CHL™/ APILAB Plus version 3.3.3 and genotypic identification and showed that the use of API 50 CHL analysis only as an identification tool is not reliable for LAB species associated with the traditional malting of sorghum, as also reported by other workers (Nigatu, 2000; Paludan-Müller et al., 2002; Lei and Jakobsen, 2004). This discrepancy should be due to the inter-strain variability in fermentation ability as described above. On this issue, Stiles and Holzappel (1997) have reported that LAB identification was first based on biochemical and physiological characteristics, but several workers have showed that using this approach only is unreliable, although some physiological characteristics have been used for the differentiation of some species. In other respects *L. fermentum* and *L. brevis* both belong to the obligately heterofermentative lactobacilli group (Novel, 1993; Hammes and Vogel, 1995) and thereby some isolates should present similar physiological characteristics. In addition, it has been revealed by DNA-DNA hybridization that *L. cellobiocus* is identical to *L. fermentum* (Vescovo et al., 1979) and the first name is now considered as synonym to the latter (Hammes et al., 1992). Nowadays, polyphasic approach using both phenotypic and genotypic characterizations is used for bacterial identification (Vandamme et al., 1996; Ehrmann and Vogel, 2005). However, API 50 CHL analysis gives important data about the carbohydrates fermentation patterns of the isolates, which are important for technological

aspects.

Concurrently with the decrease in pH and the growth of *L. fermentum*, *P. acidilactici* and *W. confusa* during the steeping of sorghum grains, the growth of Gram-negative bacteria was inhibited, as expected and shown by the use of lactic acid bacteria starter cultures for controlling undesirable microbial growth in malting of barley or sorghum (Haikara and Laitila, 1995; Boivin and Malanda, 1997; Lefyedi, 2006). In such processes, LAB fermentation inhibits the growth of pathogenic and spoilage microorganisms by several mechanisms like the production of organic acids, hydrogen peroxide, antimicrobial substances, as well as lowering pH and oxidation-reduction potential to a point where competing microorganisms are no longer able to grow (Mbugua and Njenga, 1992; Kingamko et al., 1994; Tanasupawat and Komagata, 1995). *L. fermentum* has been reported as dominant species involved in the spontaneous fermentation of kenkey, a Ghanaian maize-based food product and was selected and used as starter culture for a controlled fermentation (Halm et al., 1993; Halm et al., 1996; Annan et al., 2003).

In developing countries like Burkina Faso, the implementation of such use of starter cultures and Good Manufacturing Practices (GMP) should be considered to improve the bacteriological quality of malted cereals used for several purposes including sorghum malt-based products and infant formulations. The antimicrobial activity, the ability to produce EPSs, as well as the slight amylolytic activity and the sugar fermentation patterns of the dominant isolates (that is, *L. fermentum*) used for the present study are similar to those of *L. fermentum* isolates involved in the spontaneous fermentation of the *dolo* and *pito* wort produced from malted sorghum and previously investigated (Sawadogo-Lingani et al., 2008). These results showed that the predominant LAB isolates found in the sorghum malt originated mainly from the raw sorghum grains. This suggests that the dominating LAB isolates involved in the natural fermentation of *dolo* and *pito* wort produced from malted sorghum as previously observed (Sawadogo-Lingani et al., 2007) originated from the raw sorghum grains. *L. fermentum* isolates seem well adapted to the substrate and the environment of the production of malted sorghum and *dolo* and *pito* wort. Therefore they are potential isolates which can be used as starter cultures during steeping (initial step of malting) and would be expected to contribute to the entire process of *dolo* and *pito* fermentation until the wort cooking step. This would improve the hygienic quality of sorghum malt and sorghum malt-based products by inhibiting the growth and survival of pathogenic and spoilage microorganisms and control fermentation during processing. In this regard, suitable strains have to be selected based on their useful technological properties, that is, antimicrobial activity, rapid rate of acidification and ability to produce EPs and safety and processing aspects considered as well (Sawadogo-Lingani et al., 2008). They are also seen

as valuable starter cultures for malted cereal-based products like infant flours formulations.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Danish International Development Assistance (DANIDA) ENRECA project for the financial assistance to carry out this work. We thank Mamounata Congo from DTA/IRSAT and Per Christensen from KVL for technical assistance.

## REFERENCES

- Agu RC, Palmer GH (1996). Enzymatic breakdown of endosperm proteins of sorghum at different malting temperatures. *J. Inst. Brew.* 102: 415-418.
- Agu RC, Palmer GH (1997). Development of microorganisms during the malting of sorghum. *J. Inst. Brew.* 105: 101-106.
- Agu RC, Palmer GH (1998). A reassessment of sorghum for larger-beer brewing. *Bioresour. Technol.* 66: 253-261.
- Annan NT, Poll L, Sefa-Deddeh S, Plahar WA, Jakobsen M (2003). Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture maize dough. *J. Appl. Microbiol.* 94: 462-474.
- Barrow GIK, Feltham RKA (1993). *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria*. 3<sup>rd</sup> ed, University Press, Cambridge, p. 225.
- Boivin P, Malanda M (1997). Improvement of malt quality and safety by adding starter culture during the malting process. *MBAA Tech. Q.* 34: 96-101.
- Booyens C, Dicks LMT, Meijering I, Ackermann A (2002). Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. *Int. J. Food Microbiol.* 76: 63-73.
- Chavan JK, Kadam SS (1989). Nutritional improvement of cereals by fermentation. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 28: 349-400.
- Chinyere II, Onyekwere SE (1996). Nigerian indigenous fermented foods: their traditional process operation, inherent problems, improvements and current status. *Food Res. Int.* 29: 527-540.
- Demuyakor B, Ohta Y (1992). Malt characteristics of *Sorghum vulgare* varieties from Ghana. *J. Sci. Food Agric.* 59: 457-462.
- Dewar J, Taylor JRN, Berjak P (1997). Determination of improved steeping conditions for sorghum malting. *J. Cereal Sci.* 26: 129-136.
- Ehrmann MA, Vogel RF (2005). Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Tech.* 16: 31-42.
- Euzéby JP (2004). Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire: *Weissella* <http://www.bacteria.cict.fr/bacdicto/www/weissella.html>, 8-08-2007.
- Gregersen T (1978). Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 5: 123-127.
- Guiraud JP (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris, pp. 292-293.
- Haikara A, Laitila J (1995). Influence of lactic acid bacteria starter cultures on the quality of malt and beer. In: *Proceedings of 25<sup>th</sup> Congr. Eur. Brewery. Conv.* Oxford University Press: Brussels, pp. 249-256.
- Halm M, Lillie A, Sørensen AK, Jakobsen M (1993). Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize dough for kenkey production in Ghana. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 135-143.
- Halm M, Osei-Yaw A, Hayford A, Kpodo KA, Amoa-Awua WKA (1996). Experiences with the use of a starter culture in the fermentation of maize for 'kenkey' production in Ghana. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 531-536.
- Hammes WP, Vogel RF, Wood BJB, Holzapfel WH (1995). The genus *Lactobacillus*. The genera of lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, Scotland, Glasgow. 2: 19-54.
- Hammes WP, Vogel RF (1995). The genus *Lactobacillus*. In: Wood BJB, Holzapfel WH, (eds). *The genera of lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria*. Blackie Acad. Prof. Scotland, Glasgow, 2: 19-54.
- Hartnett DJ, Vaughan A, Van Sinderen D (2002). Antimicrobial-producing Lactic Acid Bacteria isolated from raw barley and sorghum. *J. Inst. Brew.* 108(2): 169-177.
- Holzappel WF, Geisen R, Schillinger U (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 343-362.
- Ilori MO, Fessehazion B, Olajuyigbe OA, Babalola GO, Oguniwin JO (1991). Effect of malting and brewing processes on the microorganisms associated with sorghum grains and malt. *MBAA Tech. Q.* 28: 45-49.
- Kelly L, Briggs DE (1992). The influence of grain microflora on the germinative physiology of barley. *J. Inst. Brew.* 98: 395 - 400.
- Kingambo R, Sjogren E, Svanberg U, Kaijser B (1994). pH and acidity in lactic fermenting cereal gruels: effects on viability of enteropathogenic microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 664-669.
- Lefyedi ML (2006). Control of microbial proliferation on sorghum during malting. PhD dissertation, University of Pretoria, Pretoria, South Africa (available at <http://www.upetd.up.ac.za/Thesis/available/etd-06082007-17321>).
- Lei V, Jakobsen M (2004). Microbiological characterization and probiotic potential of *koko* and *koko sour water*, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *J. Appl. Microbiol.* 96: 384-397.
- Mallesh NG, Daodu MA, Chandrasekhar A (1989). Development of weaning food formulations based on malting and roller drying of sorghum and cowpea. *Int. J. Food Sci. Technol.* 24: 511-519.
- Mbofung C M F, Fombang E N (2004). Improving the digestibility and availability of nutrients from sorghum flour through improved malting techniques. In: Brouwer I D, Traoré S A, Trèche S (eds) *Food based approaches for healthy nutrition in West Africa: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> international workshop at Ouagadougou, Burkina Faso, 23-28 November 2003*, pp. 489-502.
- Mbugua SK, Njenga J (1992). The antimicrobial activity of fermented uji. *Ecol. Food Nutr.* 28: 191-198.
- Nigatu A (2000). Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. sake*, *L. parabuchneri*, *L. gallinarum*, *L. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and Tef. *J. Appl. Microbiol.* 89: 969-978.
- Noots I, Delcour L, Michiels CW (1999). From field barley to malt: detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Crit. Rev. Microbiol.* 25: 121-153.
- Novel G (1993). Les bactéries lactiques. In: Leveau JY, Bouix M (eds) *Microbiologie Industrielle: les microorganismes d'intérêt industriel*. Technique and Documentation, Lavoisier, APRIA, Paris, pp. 169-374.
- Odufa SA, Adeyele S (1985). Microbiological changes during the traditional production of ogi-baba, a West African fermented sorghum gruel. *J. Cereal Sci.* 3: 180-193.
- Oguniwin JO, Ilori MO, Fessehazion B, Babalola GO, Olajuyigbe AO (1991). Effect of chemical treatments on the microorganisms associated with malting of sorghum grains and sorghum malt. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 139-143.
- Olasupo NA, Olukoya DK, Odufa SA (1997). Identification of lactobacillus species associated with selected African fermented foods. *Z. Naturforsch. C.* 52: 105-108.
- Onyeka U, Dibia I (2002). Malted weaning food made from maize, soybean, groundnut and banana. *J. Sci. Food Agric.* 82: 513-516.
- Paludan-Müller C, Madsen M, Sophanodora P, Gram L, Møller PL (2002). Fermentation and microflora of *plaa-som*, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. *Int. J. Food Microbiol.* 73: 61-70.
- Priest FG, Campbell I (1996). *Brewing Microbiology*. Second edn. Chapman and Hall, London, pp. 114-119.
- Sawadogo-Lingani H, Lei V, Diawara B, Nielsen DS, Møller PL, Traoré A S, Jakobsen M (2007). The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort, for production of sorghum beer. *J. Appl. Microbiol.* 103: 765-777.
- Sawadogo-Lingani H, Diawara B, Traoré AS, Jakobsen M (2008). Technological properties of *Lactobacillus fermentum* involved in the processing of dolo and pito, West African sorghum beers, for the

- selection of starter cultures. *J. Appl. Microbiol.* 104: 873-882.
- Seseña S, Sánchez I, Palop L (2004). Genetic diversity (RAPD-PCR) of lactobacilli isolated from «Almagro» eggplant fermentation from two seasons. *FEMS Microbiol. Lett.* 238: 159-165.
- Simpson WJ, Taguchi H (1995). The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*, In: Wood BJB & Holzapel WH (eds) *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Blackie Acad. Prof., Glasgow, 2: 125-172.
- Stiles ME, Holzapel WH (1997). Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- Tanasupawat S, Komagata K (1995). Lactic acid in fermented foods in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 253-256.
- Traoré T, Mouquet C, Icard-Vernière C, Traoré AS, Trèche S (2004). Changes in nutrient composition, phytate and cyanide contents and  $\alpha$ -amylase activity during cereal malting in small production units in Ouagadougou (Burkina Faso). *Food Chem.* 88: 105-114.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60: 407-438.
- Vescovo M, Dellaglio F, Botazzi V, Sarra PG (1979). Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Betabacterium* Orla-Jensen. *Microbiologica* 2: 317-330.
- Vieira-Dalodé G, Jespersen L, Hounhouigan J, Moller PL, Nago CM, Jakobsen M (2007). Lactic acid bacteria and yeasts associated with gowé production from sorghum in Bénin. *J. Appl. Microbiol.* 103: 342-349.

# Utilisation de souches sélectionnées de *Lactobacillus fermentum* et un isolat de levure comme cultures starter dans la production du *dolo*, une boisson fermentée à base de sorgho

---

Hagrétou SAWADOGO-LINGANI<sup>1</sup>, B. DIAWARA<sup>1</sup>,  
Alfred S.TRAORÉ<sup>2</sup> et Mogens JAKOBSEN<sup>3</sup>

## Résumé

Quatre souches de *Lactobacillus fermentum* (ZN4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8) et un isolat de levure (L4) ont été utilisés comme cultures starter dans la production du *dolo* au laboratoire et en unité de production. Les essais ont été réalisés selon la méthode de brassage traditionnel (double fermentation lactique puis alcoolique) puis selon une co-fermentation lactique et alcoolique. Les ensemencements ont été faits à 1 % (v/v) d'inocula de *Lact. fermentum* utilisés en monoculture (fermentation lactique) et à 0,5 % (v/v) d'inoculum de levure L4 (fermentation alcoolique). Le pH et la biomasse microbienne ont été déterminés durant la fermentation ; les caractéristiques organoleptiques et l'acceptabilité des échantillons de *dolo* ont été évaluées par des dégustateurs. Les concentrations en cellules viables des inocula ont été de 9 log ufc/ml pour *Lact. fermentum* et 7 log ufc/ml pour la levure L4. Une baisse du pH et/ou une bonne croissance microbienne ont été observées pendant la fermentation lactique, la fermentation alcoolique et la co-fermentation lactique et alcoolique réalisées au laboratoire. La biomasse de *Lact. fermentum* a par exemple augmenté de 5,76 - 6,08 log ufc/ml (0 h) à 8,76 - 9,11 log ufc/ml et 9,23 - 9,59 log ufc/ml respectivement en 9 h et 12 h de co-fermentation ; celle de la levure L4 a évolué de 4,92 - 5,04 log ucf/ml (0 h) à 6,25 - 6,75 log ufc/ml (9 h) et 6,98 - 7,34 log ufc/ml (12 h) ; simultanément le pH a baissé de 4,8 (0 h) à 3,74 - 4,05 (9 h) et 3,68 - 3,75 (12 h). Des résultats similaires ont été enregistrés pendant les essais basés sur le brassage traditionnel réalisés au laboratoire et en unité de production. Les échantillons de *dolo* ont présenté des caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques comparables à celles du *dolo* traditionnel et ont été jugées acceptables par les dégustateurs.

Les souches de *Lact. fermentum* utilisées ont fermenté le moût en 9 h en unité de production au lieu de 12 - 16 h (procédé traditionnel). Utilisés en culture mixte, *Lact. fermentum* et la levure L4 ont permis de produire du *dolo* en 12 h de co-fermentation au lieu de 21 - 48 h, durées combinées des fermentations lactique et alcoolique dans le procédé traditionnel. Les cultures starter ont contribué à réduire la durée de production. L'utilisation de *Lact. fermentum* comme culture starter dans la production du *dolo* peut être expérimentée à l'échelle pilote.

**Mots clés :** Bière de sorgho, *dolo*, *Lactobacillus fermentum*, levure, culture starters, fermentation.

---

<sup>1</sup> Département Technologie Alimentaire (DTA) / IRSAT / CNRST, Ouagadougou 03 BP 7047, Burkina Faso  
Tél : 00226 50 36 37 90 Email : dta@fasonet.bf ; E-mail: hagrétou@yahoo.fr

<sup>2</sup> Université de Ouagadougou / UFR-SVT / CRSBAN, Ouagadougou 03 BP 7131, Burkina Faso. Tél : 00 226 50 45 35 14  
Email : astraoire@yahoo.fr

<sup>3</sup> Department of Food Science Food Microbiology – University of Copenhagen, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C Denmark.  
Tél : + 45 35 28 32 16 Email : moj@life.ku.dk

# Use of selected strains of *Lactobacillus fermentum* and yeast isolate in the production of *dolo*, a fermented sorghum based beverage

## Abstract

Four strains of *Lact. fermentum* (ZN4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8) and one isolate of yeast (L4) were used as starter cultures for *dolo* production in laboratory and in a production site. The trials were realized according to the traditional brewing method (double lactic and alcoholic fermentation) and by lactic and alcoholic co-fermentation. The inoculations were done at 1% (v/v) with *Lact. obacillus* inocula used in single culture and at 0.5 % (v/v) with yeast L4 inoculum. pH and microbial counts were determined during fermentation ; sensory characteristics and the acceptability of the final products were evaluated by sensory testers. The viable cells counts of the inocula were 9 log cfu/ml for *Lact. fermentum* and 7 log cfu/ml for yeast L4. A decrease of pH and/or a good microbial growth were observed during the lactic fermentation, the alcoholic fermentation and the lactic-alcoholic fermentation. For example, during the co-fermentation, *Lact. fermentum* counts invreased from 5.76-6.08 log ufc/ml (0 h) to 8.76-9.11 log ufc/ml and 9.23-9.59 log ufc/ml respectively at 9 h and 12 h; yeast L4 counts increased from 4.92-5.04 log ufc/ml (0 h) to 6.25-6.75 log ufc/ml (9 h) and 6.98- 7.34 log ufc/ml (12 h); simultaneously pH decreased from 4.8 (0 h) to 3.74-4.05 (9 h) and 3.68-3.75 (12 h). Similar results were recorded during the trials based on the traditional brewing method carried up in the laboratory and in the production site. The *dolo* samples produced with the starter cultures showed physico-chemical and sensory characteristics comparable to the traditional *dolo* and were found acceptable by sensory testers.

The selected strains of *Lact. fermentum* fermented the wort at the production site in 9 h instead to 12-16 h by the spontaneous lactic fermentation (traditional brewing). Used in mix culture, *Lact. fermentum* and yeast L4 allowed to produce a kind of *dolo* in 12 h of co-fermentation instead to 21-48 h, the combined duration of both fermentations in the traditional processing. The starter cultures contributed to reduce the duration of the entire process. The use of *Lact. fermentum* as starter cultures in *dolo* production can be experimented at pilot plan level.

**Keywords:** Sorghum beer, *dolo*, *Lactobacillus fermentum*, yeast, starter cultures, fermentation.

## Introduction

Le sorgho est une céréale répandue dans les zones tropicales arides et semi-arides d'Afrique et d'Asie où il contribue pour plus de 70 % à l'alimentation des populations (HULSE *et al.*, 1980). Le sorgho a été utilisé depuis des siècles pour le brassage de la bière traditionnelle en Afrique (NOVELLIE, 1977) où plus de la moitié de sa production est utilisée pour la fabrication de cette boisson (RUBAYIZA, 1998). La fabrication des bières traditionnelles reste une des principales utilisations du sorgho en Afrique. Les bières traditionnelles ou bières de sorgho sont les boissons fermentées les plus répandues en Afrique de l'Ouest. C'est le cas du *dolo*, du *pito* et bien d'autres boissons similaires produites et consommées au Burkina Faso, au Mali, au Ghana, au Togo, au Bénin, en Côte d'Ivoire et au Nigéria. Les bières de sorgho tout comme les autres aliments fermentés d'Afrique sont essentiellement issues de technologies traditionnelles basées sur une fermentation naturelle non contrôlée ; les microorganismes impliqués proviennent du substrat, du matériel utilisé et de l'environnement de production. Cette méthode de fermentation présente des inconvénients notamment un faible rendement, une variabilité de la qualité et de la stabilité des produits finis, des risques de contamination par des microorganismes et/ou des métabolites indésirables

(MOTARJEMI, 2002). Le développement de cultures starter dans les unités artisanales et l'application des bonnes pratiques d'hygiène, constituent une approche appréciable pour contrôler et optimiser les conditions de fermentation, puis contribuer de manière significative à l'amélioration de ces technologies traditionnelles (SANNI, 1993 ; HOLZAPFEL, 2002 ; ROLLE and SATIN, 2002 ; ACHI, 2005). L'utilisation de cultures starter impliquant des bactéries lactiques a été expérimentée dans la production de produits fermentés africains comme par exemple le gari (OFUYA et NNAJIOFOR, 1989), le fufu (OYEWOLE, 1990), le kenkey (HALM *et al.*, 1996), le Kivunde (KIMARYO *et al.*, 2000), le togwa (MUGULA *et al.*, 2003), le gowé (VIÉRA-DALODÉ *et al.*, 2008). L'utilisation de souches de *Lactobacillus* spp. comme cultures starter en brasserie moderne pour la fabrication des bières de fermentation lactique est bien connue dans les pays développés (HAMMES *et al.*, 1992). En Afrique du Sud, une souche thermophile de *Lactobacillus delbrueckii* a été expérimentée dans l'acidification de la bière de sorgho (HAGGBLADE and HOLZAPFEL, 1989). Des essais de brassage du *pito* Nigérian en laboratoire ont été réalisés avec des cultures starter constituées d'une combinaison de *Lactobacillus plantarum* et *Saccharomyces cerevisiae*, de *Pediococcus halophilus* et *Candida tropicalis* (ORJI *et al.*, 2003).

Le brassage traditionnel du *dolo* à partir du malt de sorgho comporte deux fermentations : une fermentation lactique naturelle du moût qui dure 12-16 h puis une fermentation alcoolique du moût acidifié qui dure 9-12 h (SAWADOGO-LINGANI *et al.*, 2007). En général, la fermentation alcoolique des bières traditionnelles met déjà en pratique l'utilisation de cultures starter de levure, ce qui n'est pas le cas pour la fermentation lactique. Ainsi, la fermentation alcoolique est conduite soit par l'addition de levure locale provenant de la production précédente, soit par la pratique de la technique de « pieds de cuve ». Ces pratiques combinées à l'utilisation répétée du même matériel limitent les risques d'accidents de fabrication et favorisent la sélection de souches mieux adaptées ayant des caractéristiques spécifiques intéressantes (HOLZAPFEL, 2002). Nos précédents travaux ont mis en évidence une fermentation lactique naturelle dans le brassage traditionnel du *dolo* et du *pito* avec *Lactobacillus fermentum* comme espèce dominante impliquée (SAWADOGO-LINGANI *et al.*, 2007). Pour ce qui concerne la fermentation alcoolique, *Saccharomyces cerevisiae* a été identifié comme espèce dominante de la levure locale (VAN DER AA KÜHLE *et al.*, 2001 ; GLOVER *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'étude des propriétés technologiques des isolats de *Lactobacillus fermentum* responsables de l'acidification naturelle du moût du *dolo* et du *pito* a révélé des propriétés intéressantes pour certaines souches qui peuvent être utilisées comme cultures starter pour une fermentation lactique contrôlée du moût (SAWADOGO-LINGANI *et al.*, 2008).

L'objectif du présent travail est d'expérimenter l'utilisation de souches sélectionnées de *Lactobacillus fermentum* pour une fermentation contrôlée par inoculation du moût, au laboratoire et en unité de production du *dolo* (milieu réel), afin d'évaluer la faisabilité.

## Matériel et méthodes

Trois séries d'essais de production de *dolo* ont été réalisées :

- la première série a été réalisée au laboratoire ; des échantillons de *dolo* ont été produits en adaptant la méthode traditionnelle de brassage, avec cependant une fermentation lactique contrôlée du moût par inoculation de souches de *Lactobacillus fermentum*, suivie d'une fermentation alcoolique contrôlée du moût acidifié par inoculation d'un isolat de levure ;

- la deuxième série a été également réalisée au laboratoire ; des échantillons de *dolo* ont été produits par co-fermentation lactique et alcoolique contrôlée par inoculation en culture mixte de *Lact. fermentum* et l'isolat de levure ; le moût fermentescible utilisé comme substrat a été obtenu par une technique basée sur la méthode traditionnelle d'extraction du moût ;
- la troisième série a été réalisée dans une unité de production (milieu réel) ; des échantillons de *dolo* ont été produits en utilisant les souches de *Lact. fermentum* pour une fermentation lactique contrôlée du moût, puis l'isolat de levure pour une fermentation alcoolique contrôlée du moût acidifié.

Du *dolo* traditionnel a été produit pour servir de témoin. Les échantillons de *dolo* obtenus ont été soumis à l'appréciation de dégustateurs.

## Préparation des inocula de *Lactobacillus fermentum* pour la conduite de la fermentation lactique du moût

Les souches utilisées ont été sélectionnées parmi les isolats dominants de *Lact. fermentum* impliqués dans la production du moût du *dolo* (SAWADOGO-LINGANI *et al.*, 2007) et dont les propriétés technologiques ont été étudiées (SAWADOGO-LINGANI *et al.*, 2008). Quatre (4) souches provenant de deux sites de production de *dolo* à Ouagadougou (Samandin et Zone 1) ont été sélectionnées sur la base de leurs propriétés technologiques (tableau I).

**Tableau I.** Caractéristiques technologiques des souches de *Lact. fermentum* sélectionnées pour la conduite de la fermentation lactique du moût du *dolo*.

Codes des souches / Provenance	Caractéristiques technologiques
ZN4.1 / Zone 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pouvoir acidifiant : appartient au groupe G2 avec un taux d'acidification exprimé en <math>\Delta\text{pH}</math> de <math>1,12 \pm 0,15</math> après 9 h de fermentation d'extrait aqueux de malt de sorgho</li> <li>- Activité antimicrobienne: ++ (<i>Staphylococcus aureus</i>); + (<i>Escherichia coli</i>, <i>Listeria innocua</i>)</li> <li>- Incapacité à produire des polysaccharides exocellulaires (PSE)</li> <li>- Amylase négative</li> </ul>
SF6.1a / Samandin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pouvoir acidifiant: appartient au groupe G2</li> <li>- Activité antimicrobienne: + (<i>S. aureus</i>); + (<i>E. coli</i>; <i>L. innocua</i>)</li> <li>- Capacité à produire des PSE</li> <li>-Amylase négative</li> </ul>
SF8.2 /Samandin	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pouvoir acidifiant: appartient au groupe G2</li> <li>- Activité antimicrobienne: ++ (<i>S. aureus</i>); + (<i>E. coli</i>)</li> <li>- Incapacité à produire des PSE</li> <li>-Amylase négative</li> </ul>
SD1.8 /Samandin	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pouvoir acidifiant : appartient au groupe G1 avec un taux d'acidification exprimé en <math>\Delta\text{pH}</math> de <math>1,14 \pm 0,15</math> après 6h de fermentation d'extrait aqueux de malt de sorgho</li> <li>- Activité antimicrobienne: ++ (<i>S. aureus</i>) ; - (<i>E. coli</i>)</li> <li>- Capacité à produire des PSE</li> <li>- Faible activité amylasique</li> </ul>

+ : réaction positive avec une zone d'inhibition de 1 à 5 mm de large.

++ : réaction positive avec une zone d'inhibition de 6 à 10 mm de large.



**Préparation des inocula** : les souches de *Lact. fermentum* conservées dans du glycérol à -80 °C, ont été revivifiées sur la gélose MRS (48 h, 37 °C en anaérobiose). Pour chaque souche, un bouillon de culture (24 h, 37 °C) a été préparé dans un tube à essai contenant 10 ml de bouillon MRS stérile, inoculé avec une boucle de culture prélevée sur une colonie isolée. Une préculture de 16-18 h (30°C) est ensuite préparée avec du bouillon MRS (100 ml) ensemencé à 1 % (v/v) avec le bouillon de culture précédent. La préculture est centrifugée (7 000 g, 5 mn, 4°C) à l'aide d'une centrifugeuse (Sigma 1K15 Struers, Kebolab). Le surnageant est éliminé et le culot est lavé une fois avec 100 ml d'eau distillée stérile, puis repris dans 100 ml d'eau distillée stérile. La suspension bactérienne ainsi obtenue a constitué l'inoculum. La concentration en cellules viables (ufc/ml) des inocula a été déterminée sur la gélose MRS. Pour les essais en milieu réel, la préculture de 16 - 18 h (37 °C) a été préparée avec une suspension aqueuse de farine de malt de sorgho à 15 % (m/v) préalablement stérilisée à 121 °C pendant 15 mn puis refroidie ; celle-ci a été utilisée directement comme inoculum.

## **Préparation de l'inoculum de levure pour la conduite de la fermentation alcoolique du moût**

### **Isolement de la levure**

Des isolats de levure ont été collectés à partir de deux échantillons de *dolo* prélevés au site de Samandin (Ouagadougou). Après une culture sur la gélose Sabouraud Chloramphénicol, les colonies de levures ont été isolées et purifiées par cultures successives sur la gélose à l'extrait de malt (Merk) et dans du bouillon à l'extrait de malt (Merk). Les isolats ont été caractérisés par la morphologie des colonies et celle des cellules en contraste de phase par observation microscopique puis par le profil d'assimilation des hydrates de carbone en utilisant les galeries API ID 32 C. La majorité des isolats (17/20) dont l'isolat L4 a présenté des caractéristiques morphologiques et des profils d'assimilation des hydrates de carbone similaires à ceux de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* rapportés dans la littérature (GUIRAUD, 1998 ; GLOVER *et al.*, 2005). L'isolat L4 dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau II a été retenu pour la fermentation alcoolique. Son identification n'ayant pas été faite (séquençage de l'ADN), l'isolat L4 appartiendrait au genre *Saccharomyces* spp.

### **Préparation de l'inoculum de levure**

L'isolat L4 a été revivifié sur la gélose à l'extrait de malt (30 °C, 48 h) ; un bouillon de culture (24 h, 30 °C) a été préparé dans un tube à essai contenant 10 ml d'extrait de malt stérilé, inoculé avec une boucle de culture prélevée sur une colonie isolée. Une préculture de 16 - 18 h (30 °C) est ensuite préparée avec de l'extrait de malt (150 ml) ensemencée à 1 % (v/v) avec le bouillon de culture précédent. La préculture a été centrifugée (5 000 g, 5 mn, 4 °C), le surnageant est éliminé et les cellules sont lavées avec de l'eau distillée stérile, puis reprises dans 150 ml d'eau distillée stérile. La suspension obtenue a été utilisée comme inoculum pour la fermentation alcoolique. Pour les essais en unité de production, la préculture a été préparée avec du moût, puis utilisée directement comme inoculum. La concentration en cellules viables (ufc/ml) des inocula a été déterminée sur la gélose Sabouraud Chloramphénicol.

**Tableau II.** Caractéristiques de la levure L4 utilisée pour la fermentation alcoolique du moût.

Paramètres	Caractéristiques
Morphologie des colonies	-Colonies lenticulaires ou étoilées dans la gélose Sabouraud chloramphénicol ensemencée dans la masse. -Colonies rondes, blanchâtres, humides et crème sur la gélose à l'extrait de malt ensemencée en surface.
Morphologie des cellules	Grosses cellules sphériques à ovales, isolées, en paires, à bourgeonnement multipolaire, formant des cellules agglutinées.
Assimilation des sucres (API ID 32 C)* :	
Glucose	+
Galactose	+
Saccharose	+
Maltose	+
Tréhalose	+
$\alpha$ -méthyl-D-glucoside	+
Autre	Odeur caractéristique prononcée
Identité probable	<i>Saccharomyces</i> spp.

+: réaction positive ; \*: les réactions sont négatives pour les autres hydrates de carbone.

## Les essais de production du *dolo* au laboratoire

Deux types d'essais basés sur la méthode traditionnelle d'extraction du moût ont été réalisés au Laboratoire de microbiologie du Département Technologie Alimentaire (DTA) de l'IRSAT / CNRST, mais sans utiliser l'extrait de *volga* :

- production d'échantillons de *dolo* par double fermentation lactique puis alcoolique (procédé traditionnel) : la fermentation lactique a été faite après un ensemencement du moût avec *Lact. fermentum* ZN4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8, utilisés en monoculture et la fermentation alcoolique des moûts acidifiés par inoculation avec la levure L4 ;
- production d'échantillons de *dolo* par co-fermentation lactique et alcoolique : le moût clarifié et concentré est ensemencé avec chacune des souches de *Lact. fermentum* et la levure L4 (culture mixte) puis incubé pour la fermentation.

## Utilisation des souches sélectionnées en double fermentation lactique puis alcoolique du moût

### Préparation du substrat et conduite de la fermentation lactique

Le substrat a été préparé avec de la farine de malt de sorgho (prélevée au site de Samandin) selon la méthode traditionnelle de préparation du moût du *dolo*. Une suspension aqueuse (800 ml) de farine de malt de sorgho à 15 % (m/v) est préparée dans une fiole de 2 litres avec de l'eau distillée. La suspension est agitée pendant 10 mn (agitateur magnétique), puis laissée à décanter pendant 1 h ; le surnageant est recueilli et le culot est dilué dans 200 ml d'eau distillée puis chauffé sous agitation magnétique (plaque chauffante) jusqu'à ébullition. Le culot bouillant est mélangé au surnageant ; le mélange est agité pendant 20 mn, stérilisé (121 °C, 20 mn) puis refroidi à la

température du laboratoire ; le volume est ajusté à 1 000 ml avec de l'eau distillée stérilisée et la suspension est utilisée comme substrat pour la fermentation lactique. Pour chaque souche de *Lact. fermentum* ZN4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8, le substrat est préparé comme décrit dans quatre (4) fioles de 2 litres (1000 ml de substrat / fiole). Un substrat non ensemencé est préparé pour servir de témoin. L'ensemencement a été fait en monoculture à un taux de 1 % (v/v) d'inoculum de *Lact. fermentum* ZN4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8. Les suspensions ensemencées sont homogénéisées puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Des prélèvements (10 ml) en conditions aseptiques sont faits toutes les 3 h après homogénéisation pour la mesure du pH et le dénombrement des cellules viables de lactobacilles. Pour chaque souche, lorsque le pH du substrat est de l'ordre de 3,5 - 3,8 (pH requis pour le moût du *dolo*), la fermentation lactique est arrêtée dans deux des quatre fioles et le temps de fermentation est noté ; le contenu de ces deux fioles est alors préparé pour la fermentation alcoolique. La fermentation lactique et les prélèvements ont été poursuivis dans les autres fioles dans l'objectif de disposer de données sur l'évolution du pH et de la biomasse jusqu'à 24 h.

### **Préparation du moût acidifié par fermentation lactique et conduite de la fermentation alcoolique**

Pour chaque souche lactique, le contenu des deux précédentes fioles de fermentation lactique a été préparé pour la fermentation alcoolique. Le surnageant acidifié est collecté dans les deux fioles, puis mélangé et concentré par ébullition sur une plaque chauffante. Le mélange des culots est dilué avec 100 ml d'eau bouillante, filtré et le filtrat est rajouté au surnageant en chauffage. Le moût acidifié est concentré à  $12 \pm 1^\circ\text{Brix}$  (la concentration en matière sèche soluble de moûts prélevés dans les sites de production est de 11 - 14 °Brix). Le moût concentré est refroidi et décanté, puis le surnageant est recueilli et utilisé comme moût final pour la fermentation alcoolique. Le moût acidifié final issu de chaque souche de *Lact. fermentum* est réparti dans deux erlenmeyers (erlens) de 500 ml à raison de 300 ml/erlen. Deux lots de 4 erlens sont ainsi obtenus pour les 4 souches. Le moût est ensemencé à 0,5 % (v/v) d'inoculum de levure L4, puis incubé à 30 °C pour la fermentation alcoolique. Au bout de 12 h d'incubation, la fermentation alcoolique est arrêtée pour le premier groupe de 4 erlens mais elle est poursuivie pour le deuxième groupe, afin de disposer de données sur l'évolution du pH et de la biomasse levurienne jusqu'à 24 h d'incubation. Des prélèvements ont été faits toutes les 3 h après homogénéisation du mélange pour la mesure du pH et le dénombrement des cellules viables de levure. Pour se rapprocher du *dolo* traditionnel dont la durée de la fermentation alcoolique varie de 9 - 12 h selon les sites de production (SAWADOGO-LINGANI *et al.*, 2007), seuls les échantillons de *dolo* de 12 h de fermentation alcoolique ont été soumis à l'appréciation du jury de dégustateurs.

### **Utilisation des souches sélectionnées en co-fermentation lactique et alcoolique du moût**

#### **Préparation du substrat pour la conduite de la co-fermentation**

Le substrat utilisé pour la co-fermentation est un moût concentré, non acidifié dont la concentration en matières sèches solubles est similaire au moût du *dolo* traditionnel ( $12 \pm 1^\circ\text{Brix}$ ). Il a été préparé avec de la farine de malt de sorgho selon une méthode basée sur la méthode traditionnelle de préparation du moût, sans utiliser de l'extrait de *yolga*. Des paramètres physico-chimiques (pH, Brix, température) ont été mesurés tout au long de la préparation du substrat. Une suspension aqueuse (2 litres) de farine de malt de sorgho à 15 % (m/v) a été préparée dans un erlen de 2 litres avec de l'eau distillée. La suspension est agitée (10 mn), décantée (1 h) et le surnageant (surnageant A) est recueilli (mesure du pH, degré Brix, température). Le culot est

dilué dans 400 ml d'eau distillée puis chauffé sous agitation (plaque chauffante magnétique) jusqu'à ébullition (mesure de température, pH, degré Brix). Le culot bouillant est mélangé au surnageant A ; la suspension obtenue est homogénéisée et décantée pendant 3 h à la température ambiante (mesure de température, degré Brix et pH à chaque heure), puis le surnageant (surnageant B) est recueilli (mesure de degré Brix, pH, température) ; la suspension intermédiaire est recueillie séparément, diluée dans 100 ml d'eau distillée puis chauffée jusqu'à ébullition. Après une décantation, le surnageant est recueilli, mélangé au surnageant B (mesure de degré Brix et pH), puis le mélange est concentré par ébullition pendant 2 h. La cuisson/concentration est arrêtée lorsque la concentration du moût est de  $12 \pm 1^\circ\text{Brix}$ . Le moût concentré est refroidi et décanté à la température du laboratoire, puis le surnageant est utilisé comme substrat (moût concentré non acidifié) pour la co-fermentation.

### **Ensemencement et conduite de la co-fermentation lactique et alcoolique**

Les inocula de *Lact. fermentum* (ZN4.1, SF6.1a, SF8.2, SD1.8) et l'inoculum de levure L4 ont été utilisés. Le moût concentré non acidifié est réparti dans 17 erlens de 500 ml à raison de 300 ml/erlen, stérilisé ( $121^\circ\text{C}$ , 20 mn) puis refroidis à la température du laboratoire. Le contenu de chaque erlen est simultanémentensemencé avec une souche *Lact. fermentum* à un taux de 1 % d'inoculum (v/v) et la levure L4 à un taux de 0,5 % d'inoculum (v/v) ; cette opération est répétée 4 fois pour chaque souche de *Lact. fermentum*. Le moûtensemencé est homogénéisé puis incubé ( $37^\circ\text{C}$ , 24 h). Un substrat nonensemencé est utilisé comme témoin. Des prélèvements (10 ml) sont faits dans des conditions aseptiques toutes les 3 h pour le dénombrement des cellules viables de *Lact. fermentum*, de levure L4 et pour la mesure du pH.

Des échantillons de *dolo* obtenus après 12 h et 24 h de co-fermentation ont été soumis à l'appréciation du jury de dégustateurs.

### **Les essais réalisés en unité de production du *dolo***

Ces essais ont été réalisés au Secteur 3 (Ouagadougou), avec la collaboration de Mesdames Marie Solange Somda et Rosalia Méda.

### **Préparation du substrat pour la fermentation lactique**

La méthode traditionnelle a été suivie. Pour minimiser les risques de contamination, le matériel utilisé est soigneusement lavé à l'eau savonneuse, rincé à l'eau potable puis décontaminé par trempage à l'eau bouillante pendant 15 mn ; les produits sont couverts pendant la production. Une suspension de farine de malt de sorgho blanc/eau/extrait de yolga dans les proportions 1/4/1 (v/v/v) a été préparée, puis soumise aux opérations de brassage traditionnel du *dolo* jusqu'à l'opération qui consiste à mélanger le surnageant et le culot bouillant et ce, selon le savoir faire de la dolotière. Le mélange (surnageant + culot bouillant) est décanté (2 h) et le surnageant est recueilli. Pour la conduite de la fermentation lactique, quatre mélanges surnageant (7 litres) /culot (7 litres) sont constitués dans des casseroles en aluminium munies de couvercles. Le reste du surnageant est mélangé au reste du culot pour une acidification naturelle destinée à une production parallèle de *dolo* traditionnel. Les mélanges constitués sont refroidis à  $35 - 37^\circ\text{C}$  puisensemencés.

## Ensemencement et conduite de la fermentation lactique

En rappel, les inocula lactiques utilisés ici sont préparés avec une suspension aqueuse stérilisée de farine de malt de sorgho. Le contenu de chaque casserole (14 litres) estensemencé à 1 % (v/v) d'inoculum de *Lact. fermentum*. Le mélange est laissé à fermenter à la température ambiante de la salle. Des prélèvements sont faits toutes les 3 h pour la mesure du pH, le dénombrement des cellules viables de lactobacilles et de coliformes totaux ; la fermentation est arrêtée lorsque le pH requis de 3,5 - 3,8 est atteint et le temps de fermentation effectif est noté.

## Préparation du moût acidifié et conduite de la fermentation alcoolique

Lorsque le pH de la suspension fermentée par chaque souche lactique atteint la valeur requise, le surnageant est recueilli et mis à chauffer pour arrêter le processus de fermentation. Le culot acidifié est filtré avec ajout d'eau et d'extrait de *volga*, puis le filtrat est rajouté au surnageant en cuisson. La concentration par ébullition est réalisée par chauffage au gaz pendant environ 2 h. Le moût concentré est refroidi et décanté à la température ambiante pendant 3 h ; le surnageant est utilisé comme moût pour la fermentation alcoolique. L'ensemencement est fait à 0,5 % d'inoculum de levure L4 et le moût laissé à fermenter pendant 12 h à la température ambiante de la salle. Des prélèvements sont effectués au début et en fin de fermentation pour la mesure du pH et le dénombrement de levures et de coliformes totaux.

Cinq (5) échantillons de *dolo* ont été produits : quatre (4) avec les souches de *Lact fermentum* et l'isolat L4 de levure, portant les références ZN4.1/L4, SF6.1a/L4, SF8.2/L4 et SD1.8/L4 et un échantillon de *dolo* traditionnel référencé DT. Ces échantillons ont été conditionnés en bidons puis transportés au DTA pour l'évaluation sensorielle par un échantillon de consommateurs.

## Analyse des paramètres microbiologiques et physico-chimiques

La composition en macronutriments des échantillons de farine de malt de sorgho utilisés pour les essais au laboratoire et en unité de production a été déterminée. Les protéines totales ont été déterminées par la méthode Kjeldahl (NF V03-050, 1970), la matière grasse par extraction au Soxhlet, les cendres ou sels minéraux totaux par incinération à 550°C (NF V03-760, 1981), l'humidité par dessiccation à 105°C (NF V03-707, 2000) ; les taux sucres totaux ont été calculés par différence et les sucres réducteurs par la méthode au dinitrosalisilate (MILLER, 1959). Ces caractéristiques ont été de  $9,9 \pm 0,9$  % pour l'humidité,  $77,9 \pm 2,4$  % pour les sucres totaux,  $5,2 \pm 0,5$  % pour les sucres réducteurs,  $8,2 \pm 0,8$  % pour les protéines totales,  $1,8 \pm 0,4$  % pour la matière grasse et  $2,2 \pm 0,3$  % pour les sels minéraux totaux.

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Consort P201 Scientific Instrument, Turnhout, Belgium); le degré Brix a été déterminé au refractomètre (Krüss Optronic GmbH, Hamburg, Germany).

Le dénombrement des cellules viables des microorganismes a été réalisé en triple par la technique de comptage des colonies sur milieu gélosé et les résultats ont été exprimés en ufc/ml (ou /g). La suspension mère a été préparée avec 1 ml d'échantillon et 9 ml de diluant stérile (0,85 % de peptone, 0,1 % de NaCl, pH  $7,0 \pm 0,2$ ). Les cellules viables de levure L4 ont été dénombrées sur le milieu Sabouraud Chloramphénicol après 72 h d'incubation à 30 °C. Les cellules viables de *Lact. fermentum* ont été dénombrées sur le milieu MRS gélosé après 72 h d'incubation à 37 °C en anaérobiose (jarres d'anaérobiose et Anaréocult A). Les coliformes totaux ont été dénombrés sur le milieu VRBL après 24 h d'incubation à 30 °C.

## Evaluation sensorielle des échantillons de *dolo*

### Evaluation des échantillons de *dolo* produits au laboratoire

L'évaluation sensorielle a porté sur les quatre échantillons de *dolo* obtenus par une fermentation lactique (arrêtée à pH 3,5-3,8, soit 6-9 h selon les souches) puis une fermentation alcoolique de 12 h, et les échantillons obtenus par une co-fermentation de 12 h et 24 h. L'évaluation a été faite par un jury de dégustateurs non entraînés composé de cinq consommateurs de *dolo*. Chaque dégustateur a reçu un échantillon codifié (30 ml) de chacun des 4 types de *dolo* et un verre d'eau de rinçage de bouche. A l'aide d'un questionnaire guide, les caractéristiques organoleptiques notamment l'aspect général, le goût et l'arôme ont été appréciés, puis les quatre échantillons de *dolo* de chaque série ont été classés par ordre de préférence. Un des objectifs visé a été de savoir si les produits issus de la co-fermentation ont des caractéristiques comparables à celles du *dolo* traditionnel. Les fiches ont été dépouillées manuellement.

### Evaluation des échantillons de *dolo* produits en unité de production

Les cinq échantillons de *dolo* ont été soumis à l'appréciation d'un échantillon de consommateurs non entraînés constitué de 21 personnes, conformément à un questionnaire guide axé sur l'arôme, le goût et le classement selon la préférence. Chaque dégustateur reçoit un questionnaire, une explication par rapport à l'objectif de la séance de dégustation, des échantillons codifiés des 5 types de *dolo* et un verre d'eau de rinçage de bouche. Les dégustateurs non alphabétisés sont assistés pour le remplissage des fiches. Les fiches ont été dépouillées manuellement.

## Résultats

### Caractéristiques des inocula des souches utilisées

Les inocula de *Lact. fermentum* ZN 4.1, SF6.1a, SF8.2 et SD1.8 utilisés pour la fermentation lactique au laboratoire contenaient entre 8,97 log ufc/ml et 9,20 log ufc/ml. Les inocula préparés avec la suspension aqueuse stérilisée de farine de malt de sorgho ont été plus concentrés en cellules viables avec des valeurs comprises entre 9,83 log ufc /ml et 9,96 log ufc/ml (tableau III). Une concentration moyenne de 7,75 log ufc/ml a été obtenue pour les inocula de levure L4 utilisés pour la fermentation alcoolique des moûts acidifiés (tableau III).

**Tableau III.** Concentrations moyennes en cellules viables (log ufc/ml) des inocula de *Lact. fermentum* et de levure L4 utilisés pour les essais de fermentation

Essai	Inocula de <i>Lactobacillus fermentum</i> (log ufc/ml)				Inocula de levure L4 (log ufc/ml)
	ZN4.1	SF6.1a	SF8.2	SD1.8	
Laboratoire	8,97	9,15	9,20	9,08	7,75
Unité de production	9,83	9,87	9,93	9,96	nd

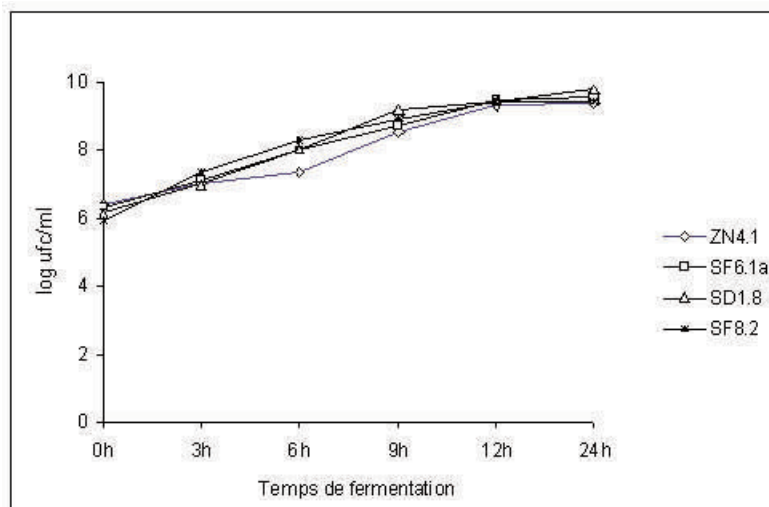
nd : non déterminé

## Evolution des paramètres physico-chimiques et microbiologiques pendant les essais de fermentation au laboratoire

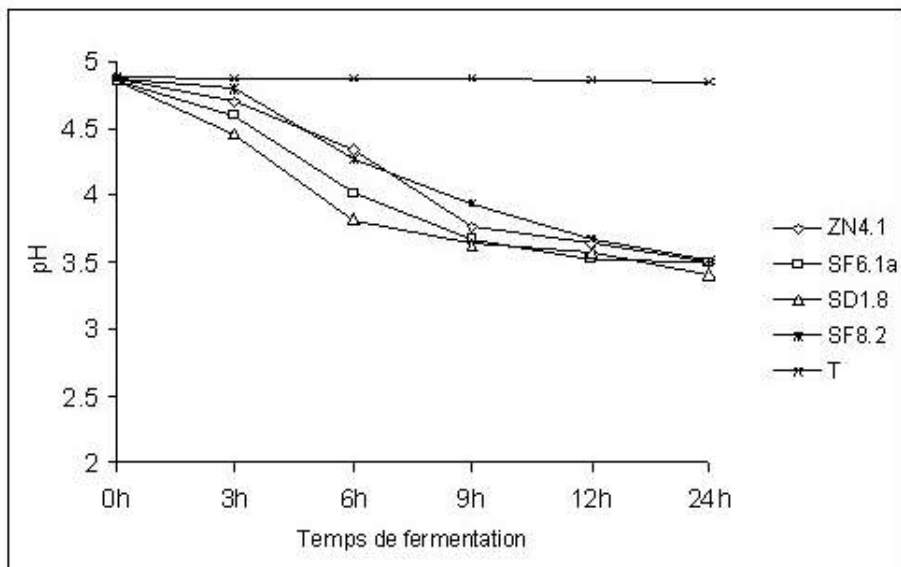
### pH et développement des microorganismes au cours de la double fermentation lactique puis alcoolique du moût

Les résultats sont illustrés par les figures 1 à 4. La fermentation lactique de la suspension aqueuse de farine de malt de sorgho par *Lact. fermentum* ZN4.1, SD1.8, SF6.1a et SD8.2 utilisés en monoculture, a été caractérisée par un développement bactérien et une diminution concomitante du pH de la suspension. La biomasse lactique a augmenté de 5,94-6,41 log ufc/ml en début de fermentation à 7,34 - 8,30 log ufc/ml, 8,50 - 9,17 log ufc/ml et 9,28 - 9,46 log ufc/ml respectivement en 6 h, 9 h et 12 h de fermentation lactique (figure 1). Quant au pH de la suspension, il a baissé de 4,86 (0h) à 3,81 - 4,33, 3,62 - 3,94 et 3,52 - 3,67 respectivement en 6 h, 9 h et 12 h de fermentation (figure 2). En 24 h de fermentation lactique, la biomasse a atteint 9,36 - 9,76 log ufc/ml et le pH l'ordre de 3,40 - 3,51. Le pH du témoin a très peu varié. La souche SD1.8 se distingue des autres par son pouvoir acidifiant (figure 2).

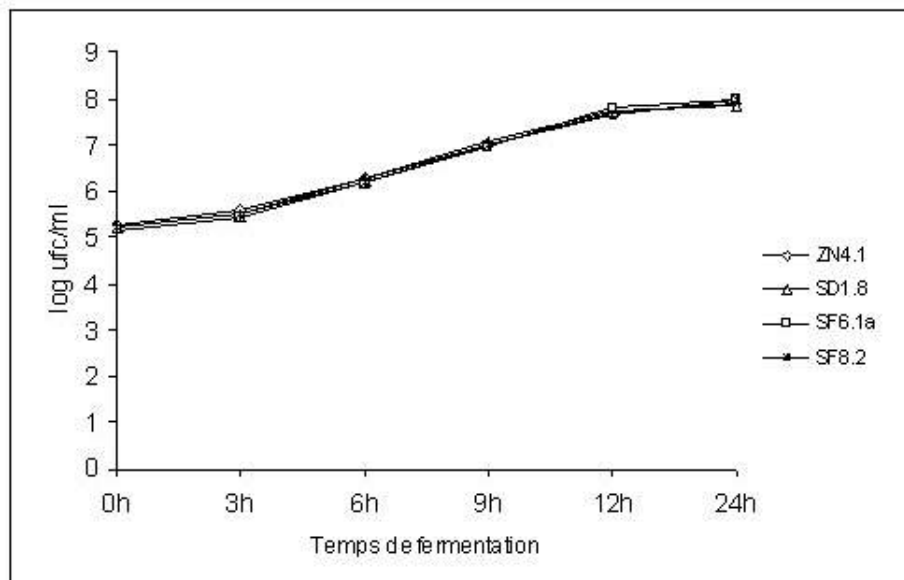
Les suspensions acidifiées ont été traitées par décantation/filtration et concentration par ébullition puis refroidies pour donner les moûts finaux utilisés comme substrat pour la fermentation alcoolique par la levure L4. Les résultats exprimés dans la figure 3 montrent des courbes de croissance de la levure L4 dans les quatre moûts acidifiés par les quatre souches de *Lact. fermentum*, très homogènes. La biomasse levurienne a augmenté de 5,17-5,28 log ufc/ml en début de fermentation à 6,18 - 6,30 log ufc/ml, 6,94 - 7,08 log ufc /ml et 7,62 - 7,79 log ufc /ml respectivement en 6 h, 9 h et 12 h de fermentation (figure 3). Une légère baisse du pH d'environ 0,1 unité pH a été observée en 12 h de fermentation alcoolique (figure 4).



**Figure 1.** Evolution de la biomasse de *Lact. fermentum* ZN4.1, SF6.1a, SD1.8 et SF8.2 durant la fermentation lactique du moût.

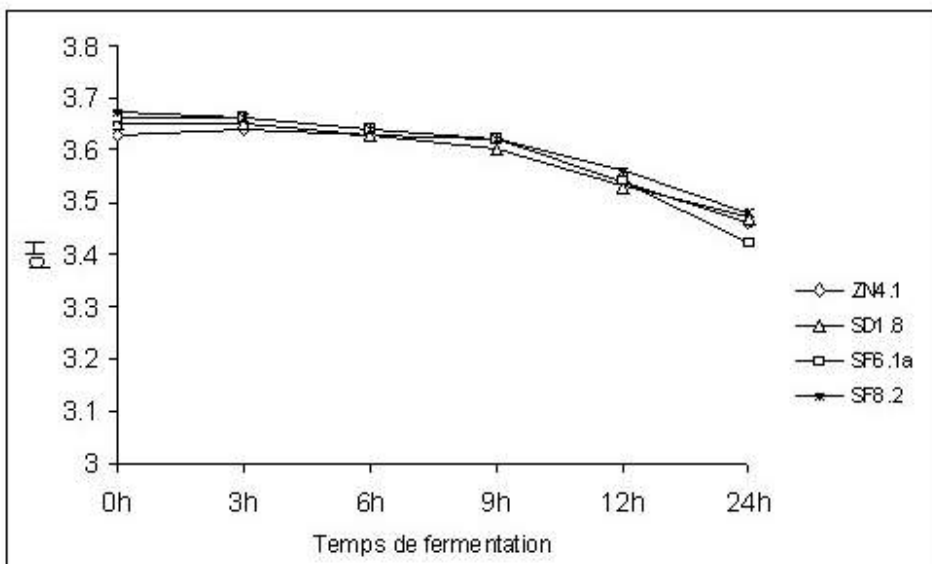


**Figure 2.** Evolution du pH durant la fermentation lactique de moûts par *Lact. fermentum* ZN4.1, SF6.1a, SD1.8 et SF6.2 ; T : témoin non ensemencé.



**Figure 3.** Evolution de la biomasse de la levure L4 pendant la fermentation alcoolique de moûts préalablement fermentés par *Lact. fermentum* ZN4.1, SD1.8 SF6.1a et SF6.2.





**Figure 4.** Evolution du pH durant la fermentation alcoolique (par la levure L4) de moûts préalablement fermentés par *Lact. fermentum* ZN4.1, SD1.8, SF6.1a et SF8.2.

### Évolution des paramètres physico-chimiques durant la préparation du substrat pour la conduite de la co-fermentation

La quantité de moût utilisée pour les essais de fermentation a nécessité plusieurs séries de préparation du substrat. Les paramètres mesurés tout au long des différentes opérations de préparation du substrat ont donné les résultats présentés dans le tableau IV. On constate que le pH a très peu varié du surnageant A (pH 4,84) à l'extrait concentré (moût final non acidifié) utilisé pour les essais (pH 4,90). La concentration en matière sèche soluble mesurée au réfractomètre a par contre augmenté : d'environ 3° Brix pour le surnageant A et le culot, elle atteint 11,2° Brix pour le culot bouillant à une température moyenne de 97,6 °C (tableau IV). Ce chauffage a permis d'enregistrer pour les mélanges (surnageant A + culot bouillant) une température moyenne de 60,4 °C et une concentration moyenne en matières sèches de 8,8° Brix. Une durée de 3 h de décanation semble avoir peu d'effet sur le degré Brix et le pH du surnageant et de la suspension intermédiaire. Le moût non concentré a un Brix moyen de 8,4 et un pH de 4,93. Après la concentration par ébullition puis le refroidissement, seul le Brix augmente et atteint environ 12,2° contrairement au pH qui varie peu, environ 4,90 (tableau IV). C'est ce moût final qui a été utilisé comme substrat pour les essais de co-fermentation.

## pH et développement des microorganismes pendant la co-fermentation lactique et alcoolique du moût

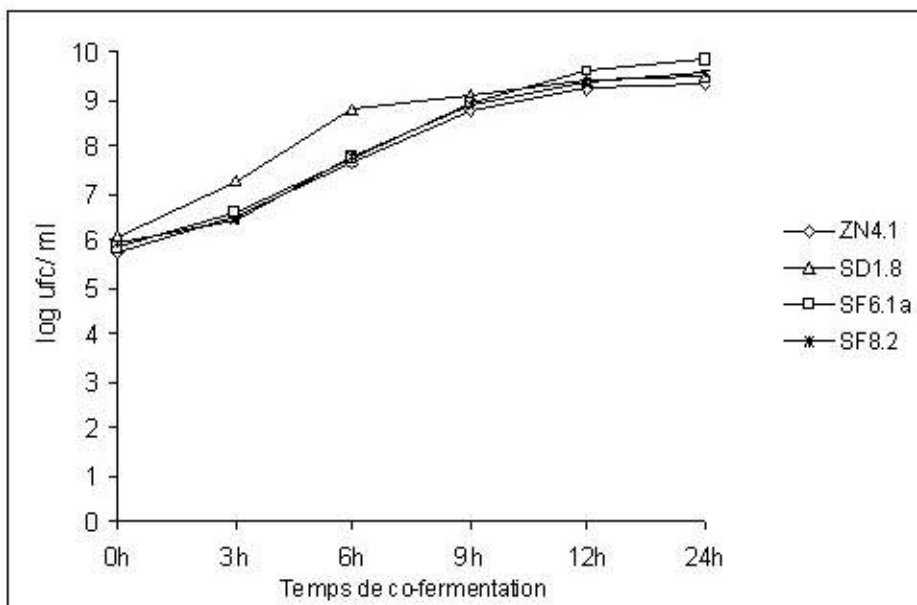
Le développement des quatre souches de *Lact. fermentum* et celui de la levure L4 pendant la co-fermentation du moût sont illustrés par les figures 5 et 6. Avec des taux d'ensemencement de 1 % (v/v) d'inoculum lactique et 0,5 % (v/v) d'inoculum de levure L4, la biomasse microbienne initiale (0 h) pour *Lact. fermentum* ZN4.1, SD1.8, SF6.1a et SD8.2 a été de l'ordre de 5,76 - 6,08 log ufc/ml ; une croissance cellulaire a été observée au cours du temps et des valeurs de 7,63 - 8,78 log ufc/ml, 8,76- 9,11 log ufc/ml et 9,23 - 9,59 log ufc/ml et 9,34 - 9,82 log ufc/ml ont été atteintes respectivement en 6 h, 9 h, 12 h et 24 h de co-fermentation (figure 5).

La biomasse de la levure L4 est passée de 4,92 - 5,04 log ufc/ml (0h), à 5,90 - 6,15 log ufc/ml, 6,25 - 6,75 log ufc/ml, 6,98-7,34 log ufc/ml et 7,11-7,50 log ufc/ml respectivement en 6 h, 9 h, 12 h et 24 h de co-fermentation (figure 6). Concomitamment à la croissance microbienne, le pH du moût qui était d'environ 4,8 en début de co-fermentation, est descendu à environ 4,08 - 4,54, 3,74 - 4,05, 3,68-3,75 et 3,43 - 3,55 respectivement en 6 h, 9 h, 12 h et 24 h de co-fermentation (figure 7). Le pH du témoin a très peu varié (4,77 - 4,80). La formation de mousse qui traduit la production de gaz notamment le CO<sub>2</sub> a été perceptible à partir de 6h de co-fermentation.

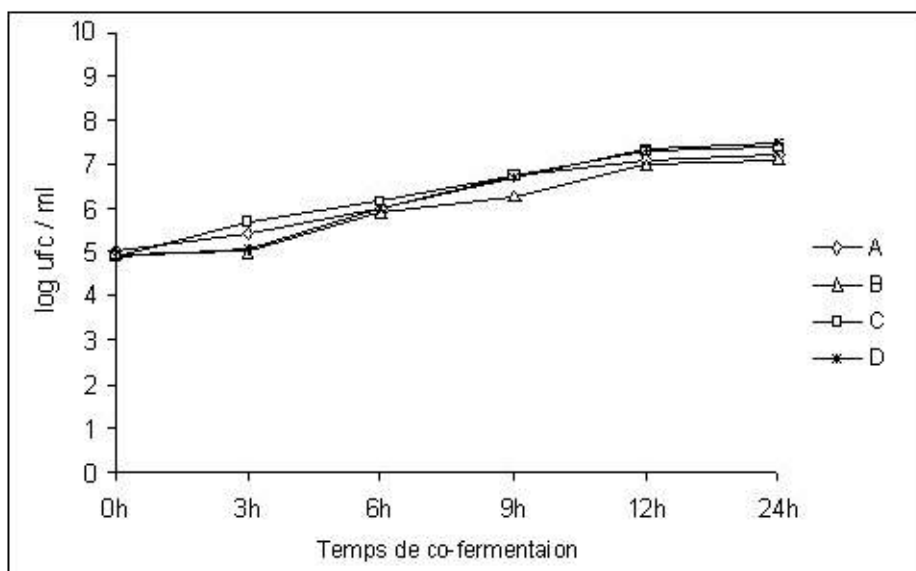
En examinant l'abaissement du pH qui résulte de la production d'acides organiques, on constate que celui-ci est retardé d'environ 2 - 3 h pour la co-fermentation (figure 7) par rapport à la fermentation lactique conduite seule (figure 2). Ainsi par exemple, si pour les quatre souches de *Lact. fermentum*, des pH de 3,68 - 3,75 ont été enregistrés en 12 h de co-fermentation, des valeurs similaires de pH (3,62 - 3,94) ont été enregistrées en 9 h de fermentation lactique. La co-fermentation semble ralentir l'abaissement du pH du milieu.

**Tableau IV.** Paramètres mesurés pendant la préparation du substrat utilisé pour les essais de co-fermentation lactique et alcoolique.

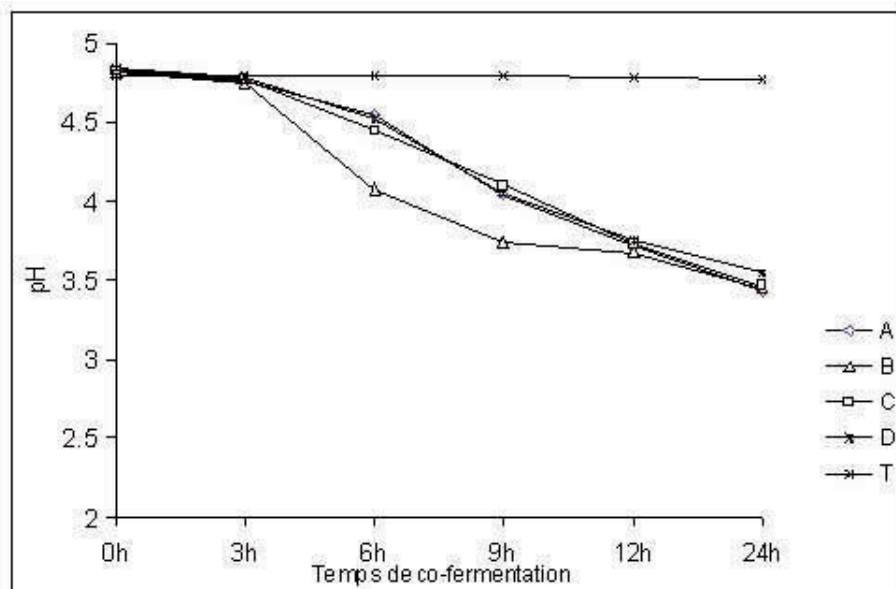
Echantillons	pH	°Brix	Température (°C)
Surnageant A (SA)	4,84 ± 0,15	3,0 ± 0,6	31,2 ± 1,6
Culot dilué avant chauffage	4,84 ± 0,15	3,0 ± 0,6	30,2 ± 1,5
Culot dilué bouillant (Cb)	4,87 ± 0,30	11,2 ± 4,7	97,6 ± 0,6
Mélange (Surnageant A + Culot bouillant)	4,84 ± 0,23	8,8 ± 1,5	60,4 ± 5,1
Mélange (Surnageant A + Culot bouillant) après 3 h de décantation	4,85 ± 0,21	9,0 ± 1,2	40,3 ± 3,1
Surnageant B	4,88 ± 0,26	8,6 ± 1,4	31,2 ± 1,4
Suspension intermédiaire	4,90 ± 0,24	8,8 ± 1,6	32,2 ± 1,2
Moût non concentré	4,93 ± 0,20	8,4 ± 1,4	30,5 ± 1,0
Moût concentré refroidi (moût final non acidifié)	4,90 ± 0,13	12,2 ± 1,0	30,8 ± 1,2



**Figure 5.** Evolution de la biomasse de *Lact. fermentum* ZN4.1, SD1.8, SF6.1a et SF8.2 pendant la co-fermentation lactique et alcoolique du moût.



**Figure 6.** Evolution de la biomasse de levure L4 pendant la co-fermentation lactique et alcoolique de moûts par *Lact. fermentum* et levure L4. ZN4.1/L4, SD1.8/L4(B), SF6.1a/L4(C) et SF8.2/L4(D).



**Figure 7.** Evolution du pH pendant la co-fermentation lactique et alcoolique de moûts par *Lact. fermentum* et levure L4. ZN4.1/L4 (A), SD1.8/L4 (B), SF6.1a/L4 (C) et SF8.2/L4 (D) ; T : Témoin non ensemencé.

### Paramètres physico-chimiques et microbiologiques pendant les essais réalisés en unité de production

Les essais en milieu réel ont donné des résultats (tableaux V et VI) comparables à ceux du laboratoire. Neuf (9) heures de fermentation lactique par les souches de *Lact. fermentum* ont été suffisantes pour atteindre le pH requis de 3,5 - 3,8. Par contre, 13 h de fermentation lactique naturelle ont été nécessaires pour obtenir un pH de 3,65 (tableau V). La biomasse microbienne a augmenté de 6,23 - 6,86 log ufc/ml (0 h) à 9,32 - 9,57 log ufc/ml en 9 h de fermentation lactique contrôlée par les souches *Lact. fermentum* (tableau VI) et de 5,25-5,41 log ufc/ml (0 h) à 7,67-7,80 log ufc/ml en 12 h de fermentation alcoolique contrôlée par la levure L4 (tableau VI). Des valeurs similaires ont été observées pour la fermentation lactique naturelle (tableau V).

**Tableau V.** pH et biomasse de bactérie lactique pendant la fermentation lactique en unité de production du *dolo*.

Temps	Fermentation lactique contrôlée par <i>Lact. fermentum</i>				Fermentation lactique naturelle (procédé traditionnel)
	ZN4.1	SD1.8	SF6.1a	SF8.2	
pH					
0 h	4,87 ± 0,03	4,88 ± 0,02	4,85 ± 0,03	4,85 ± 0,01	4,92 ± 0,02
9 h	3,76 ± 0,02	3,61 ± 0,03	3,72 ± 0,01	3,72 ± 0,02	3,65 ± 0,02 (13 h)
Biomasse (log ufc/ml)					
0 h	6,86	6,76	6,69	6,23	3,69
9 h	9,32	9,57	9,50	9,32	9,56 (13 h)

**Tableau VI.** pH et biomasse de levure pendant la fermentation alcoolique de moûts (acidifiés par *Lact. fermentum* ZN4.1, SD1.8, SF6.1a, SF8.2) en unité de production du *dolo*.

Temps	Fermentation alcoolique contrôlée par la levure L4				Fermentation par la levure locale (procédé traditionnel)
	ZN4.1/L4	SD1.8/L4	SF6.1a/L4	SF8.2/L4	
	pH				
0 h	3,74 ± 0,02	3,65 ± 0,01	3,70 ± 0,01	3,71 ± 0,01	3,74 ± 0,02
12 h	3,65 ± 0,01	3,57 ± 0,01	3,61 ± 0,02	3,63 ± 0,02	3,65 ± 0,02
	Biomasse (log ufc/ml)				
0 h	5,25	5,38	5,28	5,41	nd
12 h	7,75	7,67	7,76	7,80	7,93

nd : non déterminé

## Appréciation des échantillons de *dolo* par le jury de dégustation

### Les échantillons de *dolo* produits au laboratoire

#### Les échantillons de *dolo* produits par co-fermentation lactique et alcoolique

Les huit échantillons de *dolo* ZN4.1/L4, SD1.8/L4, SF6.1a/L4 et SF8.2/L4 de 12 h (4) et de 24 h (4) de co-fermentation ont été appréciés par 5 dégustateurs, tous agents du DTA connaissant bien le *dolo* et le consommant habituellement. Il a été demandé aux dégustateurs d'apprécier l'aspect général, le goût et la flaveur des échantillons codifiés puis de les classer par ordre de préférence. Le dépouillement a donné les tendances suivantes pour les échantillons de 12 h de co-fermentation : les 5 dégustateurs ont trouvé que les quatre échantillons répondaient aux caractéristiques du *dolo* du point de vue du goût, de la flaveur et de l'aspect général. Trois (3) dégustateurs ont noté que ces échantillons de *dolo* étaient plus troubles et contenaient trop de levures en suspension. Pour le classement selon la préférence, la tendance a été la suivante : 2 dégustateurs ont classé 1<sup>er</sup> l'échantillon SF8.2/L4, 2<sup>e</sup> les échantillons SD1.8/L4 et SF6.1a/L4, 3<sup>e</sup> l'échantillon ZN4.1/L4 qu'ils ont qualifié de *dolo* léger. Un dégustateur a par contre classé 1<sup>er</sup> l'échantillon SD1.8/L4, 2<sup>e</sup> l'échantillon ZN4.1/L4, 3<sup>e</sup> l'échantillon SF6.1a/L4, et 4<sup>e</sup> l'échantillon SF8.2/L4 ; celui-ci qualifie de *dolo* doux ses deux premiers choix et de « tossé » son dernier choix. Signalons que le qualificatif « tossé » en langue nationale moré signifie *dolo* fortement alcoolisé. Les deux autres dégustateurs ont trouvé que les quatre échantillons sont tous bons, similaires et donc difficiles de les classer. Les échantillons de 24 h de co-fermentation ont reçu une appréciation satisfaisante par les dégustateurs ; 3 dégustateurs ont relevé une acidité plus prononcée pour ces échantillons ; 3 autres les ont qualifié de « tossé ».

#### Les échantillons de *dolo* produits par double fermentation lactique puis alcoolique

Rappelons que les échantillons dégustés sont ceux obtenus par fermentation lactique de 6 - 9 h selon les souches (pH 3,5 - 3,8) suivie d'une fermentation alcoolique de 12 h. Quatre échantillons de *dolo* ZN4.1/L4, SD1.8/L4, SF6.1a/L4 et SF8.2/L4 ont été appréciés par 5 dégustateurs, agents du DTA/IRSAT dont 4 ont été membres du jury précédent. Comme dans le cas précédent, l'aspect général, le goût et la flaveur des échantillons ont été appréciés puis les échantillons ont été classés par ordre de préférence. Les tendances suivantes ont été dégagées : les 5 dégustateurs

ont trouvé que les quatre échantillons répondaient aux caractéristiques du *dolo* du point de vue du goût, de la flaveur et de l'aspect général. Pour ce qui concerne le classement selon la préférence, 1 dégustateur a porté son 1<sup>er</sup> choix sur les échantillons SF6.1a/L4 et SF8.2/L4, son 2<sup>e</sup> choix sur l'échantillon SD1.8/L4 et 3<sup>e</sup> choix sur l'échantillon ZN4.1/L4. Deux dégustateurs ont classé 1<sup>er</sup> l'échantillon SF8.2/L4, 2<sup>e</sup> l'échantillon SF6.1a/L4, et 3<sup>e</sup> les échantillons SD1.8/L4 et ZN4.1/L4. Deux autres dégustateurs ont trouvé les 4 échantillons tous acceptables et n'ont pas fait de classement particulier car ils les préfèrent tous.

### Les échantillons de *dolo* produits en unité de production

Un total de 21 dégustateurs non entraînés dont 20 de sexe masculin ont participé à l'évaluation sensorielle des 5 échantillons de *dolo* (ZN4.1/L4, SD1.8/L4, SF6.1a/L4, SF8.2/L4 et le *dolo* traditionnel DT) obtenus en unité de production. Ce jury était composé de 12 personnes consommant fréquemment le *dolo* (tous les 1 ou 2 jours), 5 personnes le consommant souvent (1 ou 2 fois/semaine) et 4 personnes le consommant rarement (1 ou 2 fois/mois). Après dépouillement, les tendances qui se sont dégagées sont les suivantes :

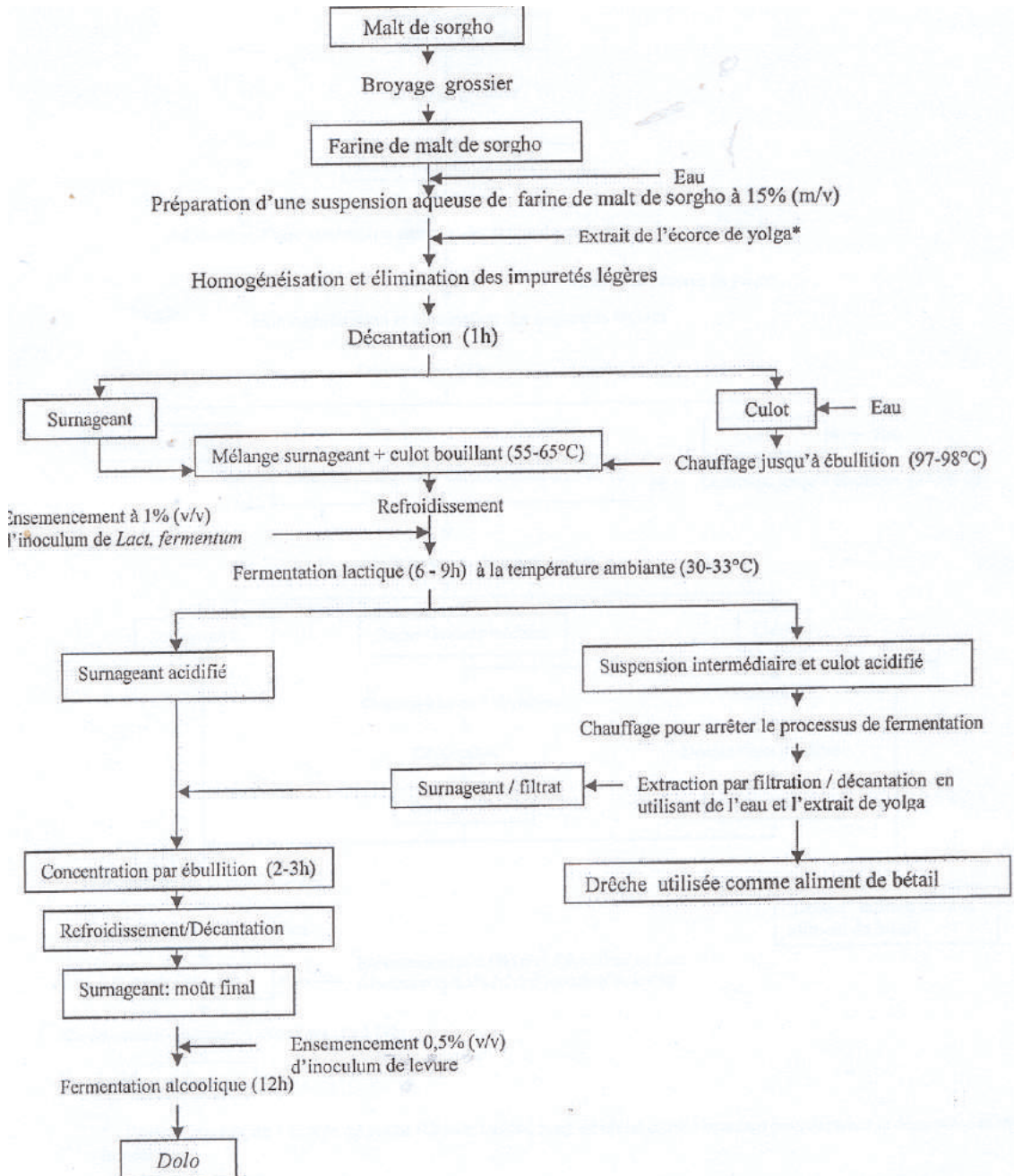
- Pour ce qui concerne le goût et l'arôme, il est ressorti que les 5 échantillons de *dolo* avaient tous le goût et l'arôme caractéristiques du *dolo* ; tous les 21 dégustateurs ont relevé cela pour le *dolo* traditionnel DT ; 20 dégustateurs l'ont noté pour les échantillons de *dolo* SD1.8/L4, SF6.1a/L4 et SD8.2/L4, et 19 dégustateurs pour l'échantillon ZN4.1/L4. Certains dégustateurs ont relevé un goût légèrement sucré pour les échantillons de *dolo* ZN4.1/L4 (17 dégustateurs), SD1.8/L4 (9 dégustateurs) et SF6.1a/L4 (8 dégustateurs) ; ces échantillons ont généralement été qualifiés de *dolo* doux ou pas suffisamment fermenté ;
- Pour le classement selon le degré de préférence le *dolo* traditionnel DT a été le mieux apprécié car il a été classé au 1<sup>er</sup> rang par 7 dégustateurs ; puis suivent les échantillons SF6.1a/L4 et SD1.8/L4 classés au 1<sup>er</sup> rang par 5 dégustateurs et enfin les échantillons ZN4.1/L4 et SD8.2/L4 classés tous deux au 1<sup>er</sup> rang par 3 dégustateurs ;
- En observations complémentaires, le *dolo* traditionnel DT a été qualifié de « plus léger » (8 dégustateurs), « fort » (7 dégustateurs), « piquant » (4 dégustateurs) ou « présentant une note atypique » (1 dégustateur). Le *dolo* SF6.1a/L4 a également été qualifié de « léger » (8 dégustateurs) et « piquant » (4 dégustateurs). Quatre (4) dégustateurs ont qualifié le *dolo* ZN4.1/L4 de « lourd » ; de même, 2 dégustateurs ont attribué le même qualificatif au *dolo* SD1.8/L4.

En somme, les échantillons de *dolo* obtenus par fermentation contrôlée avec les souches sélectionnées ont été appréciés de manière satisfaisante par le jury. Leurs caractéristiques organoleptiques apparaissent néanmoins inférieures à celles du *dolo* traditionnel. Après le *dolo* traditionnel, les échantillons de *dolo* SF6.1a/L4, SD1.8/L4 et SD8.2/L4 ont été mieux appréciés par rapport au *dolo* ZN4.1/L4.

### Diagrammes de production du *dolo* avec les souches sélectionnées

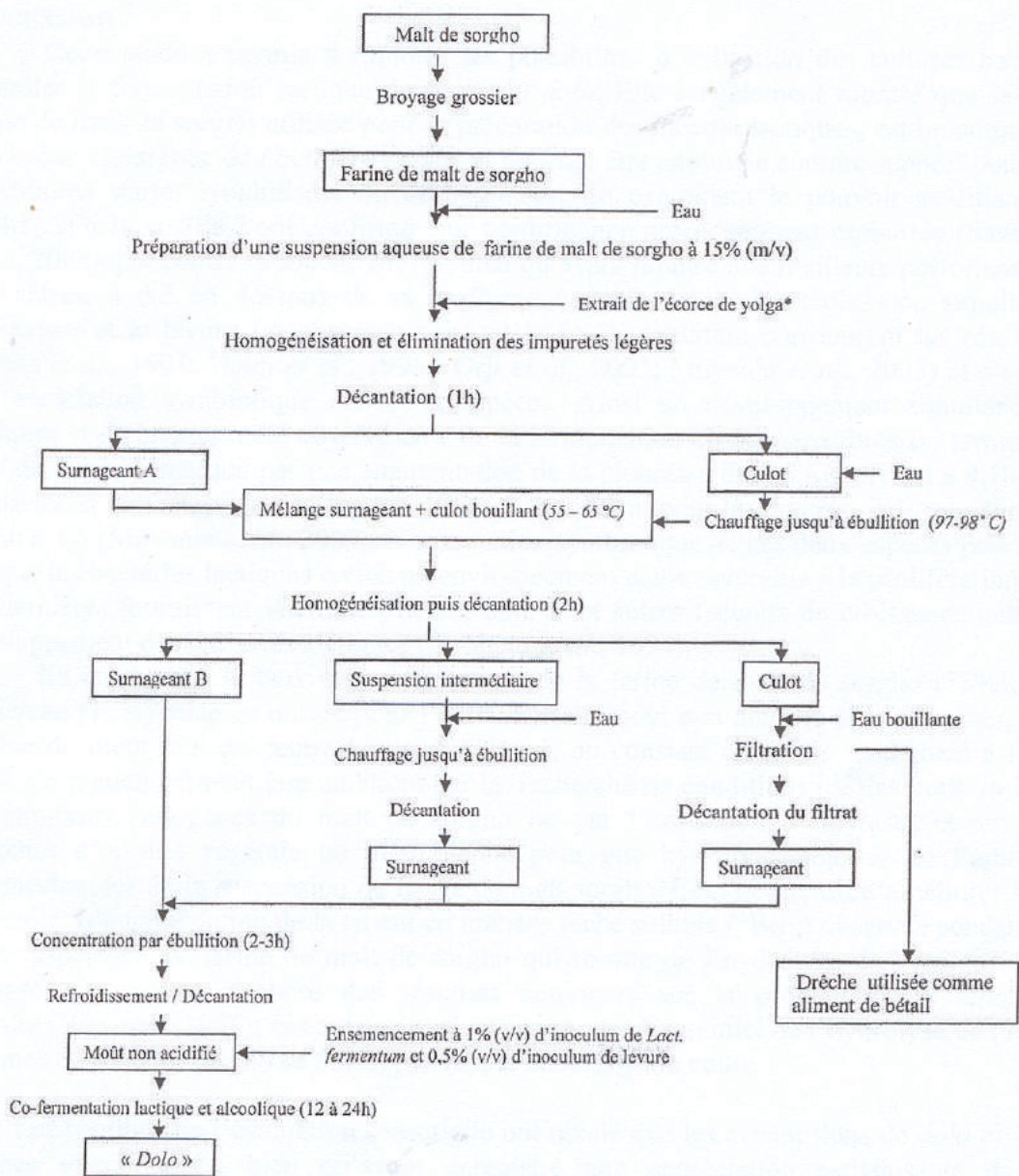
Sur la base du procédé traditionnel de fabrication du *dolo* dont le diagramme a été établi lors d'une précédente étude (SAWADOGO-LINGANI *et al.*, 2007), les résultats des essais ont permis de proposer aux unités de production, deux diagrammes de production de *dolo* avec l'utilisation de cultures starter de *Lact. fermentum* et de levure : un diagramme de production du *dolo* par double fermentation lactique puis alcoolique contrôlée par inoculation (figure 8) et un diagramme de production du *dolo* par co-fermentation lactique et alcoolique contrôlée par inoculation (figure 9). Pour la fermentation lactique, l'inoculum de *Lact. fermentum* sera préparé avec une

suspension de farine de malt de sorgho. Pour la fermentation alcoolique, l'inoculum de levure sera préparé avec du moût, ou bien pratiquer comme dans le procédé traditionnel, l'ensemencement avec la levure sèche.



**Figure 9.** Diagramme de production du *dolo* par double fermentation lactique puis alcoolique du moût avec inoculation de *Lactobacillus fermentum* et de levure.

\* : l'extrait aqueux de l'écorce de yolga (*Grewia bicolor*, Juss) est utilisé comme mucilage pour mucilage pour favoriser la décantation et clarifier le moût final.



**Figure 10.** Diagramme de production du *dolo* par co-fermentation lactique et alcoolique eu moût avec inoculation de *Lact fermentum* et de levure.

\* : l'extrait aqueux de l'écorce de yolga (*Grewia bicolor*, Juss) est utilisé comme mucilage pour mucilage pour favoriser la décantation et clarifier le moût final.



## Discussion

Cette étude a permis d'explorer les possibilités d'utilisation des cultures bactériennes pour contrôler la fermentation lactique du moût du *dolo*. Elle a également montré que la suspension de farine de malt de sorgho utilisée pour la préparation des inocula lactiques, est un substrat favorable à une bonne croissance de *Lact. fermentum*, et pourrait être exploitée comme support pour la production de cultures starter lyophilisées ou déshydratées. En examinant le pouvoir acidifiant, les souches ZN4.1, SF6.1a et SF8.2 ont confirmé leur performance précédemment rapportée (SAWADOGO-LINGANI *et al.*, 2008) ; par contre la souche SD1.8, bien qu'ayant montré une meilleure performance par rapport aux autres, a été en dessous de sa performance précédente. La croissance simultanée de *Lact. fermentum* et la levure L4 observée pendant la co-fermentation corrobore les résultats antérieurs (SULMA *et al.*, 1991 ; HALM *et al.*, 1996 ; ORJI *et al.*, 2003 ; MUYANJA *et al.*, 2003) et s'expliquerait par une association symbiotique des deux espèces. Ainsi un développement simultané de bactéries lactiques et de levures a été observé en 24 h de fermentation du bushera (boisson fermentée à base de malt de sorgho), marqué par une augmentation de la biomasse de 5,5 log ufc/ml à 9,1 log ufc/ml pour les bactéries lactiques et de 4,3 log ufc/ml à 5,8 log ufc/ml pour les levures, puis une diminution du pH de 7,0 à 4,6 (MUYANJA *et al.*, 2003). L'association symbiotique de ces deux espèces pourrait résulter du fait que les bactéries lactiques créent un environnement acide favorable à la prolifération des levures et ces dernières fournissent vitamines, acides aminés et autres facteurs de croissance indispensables au développement des bactéries lactiques (GOBBETTI *et al.*, 1994).

En comparant le taux de sucres totaux de la farine de malt de sorgho (78 %), la proportion farine/eau (15 %) mise en œuvre pour l'extraction du moût non acidifié et la teneur en matière sèche soluble du moût non concentré (environ 8°Brix), on constate un faible rendement à l'extraction du moût. Ce rendement peut être amélioré par la recherche de conditions idéales pour optimiser l'action des amylases endogènes du malt de sorgho ou par l'utilisation d'amylases et autres hydrolases exogènes d'origine végétale ou microbienne pour une hydrolyse poussée de l'amidon et autres polysaccharides de la suspension de farine de malt sorgho. Ceci permettra d'améliorer la productivité de l'unité. L'augmentation de la teneur en matière sèche soluble (°Brix) observée pendant le chauffage de la suspension de farine de malt de sorgho qui résulte de l'hydrolyse de l'amidon gélifié par les amylases du malt, corrobore des résultats antérieurs sur la production du tchapalo en Côte d'Ivoire (YAO *et al.*, 1995) ; ces auteurs avaient conclu que l'hydrolyse de l'amidon par les enzymes du malt de sorgho se faisait pendant le chauffage du culot.

Les résultats de l'évaluation sensorielle ont révélé que les échantillons de *dolo* produits avec les souches sélectionnées, bien qu'ayant enregistré une appréciation satisfaisante de la part des dégustateurs, ont présenté des caractéristiques organoleptiques inférieures à celles du *dolo* traditionnel. La fermentation lactique naturelle du moût du *dolo* traditionnel implique plus d'une espèce bactérienne avec une diversité génétique des isolats (SAWADOGO-LINGANI *et al.*, 2007) où chaque isolat contribue aux caractéristiques organoleptiques du moût. Il en est de même pour la levure locale utilisée pour la fermentation alcoolique où une biodiversité des isolats a été également mise en évidence (VAN DER AA KÜHLE *et al.*, 2001 ; GLOVER *et al.*, 2005). Le *dolo* obtenu par co-fermentation semble présenter plus d'avantages sur le plan alimentaire à cause des métabolites générés par les deux espèces qui pourraient être intéressants sur le plan nutritionnel, organoleptique et sécurité sanitaire. La co-fermentation présente également

un autre avantage qui est la disponibilité d'une culture starter mixte constituée de *Lact. fermentum* et de levure, à l'issue d'un premier essai de co-fermentation dans les unités de production de *dolo*. Une technique de collecte de la levure locale est déjà pratiquée par les dolotières bien que celle-ci nécessite une amélioration pour assurer la qualité du starter et du produit fini. Pour ce qui concerne la fermentation lactique par *Lact. fermentum*, la technique de « pied de cuve » pourrait être pratiquée par les dolotières, après un premier essai de fermentation par inoculation de *Lact. fermentum*.

Sur la base du procédé traditionnel, deux diagrammes de production du *dolo* avec fermentation contrôlée par des cultures starter ont été établis : le premier diagramme qui est similaire à celui du procédé traditionnel comporte une double fermentation lactique puis alcoolique ; le second diagramme est relatif à une co-fermentation lactique et alcoolique d'un moût clarifié non acidifié. *A priori*, l'application du premier diagramme dans les unités de production de *dolo* ne devrait pas poser de contraintes majeures car il ne diffère du diagramme traditionnel que par l'introduction des cultures de *Lact. fermentum* pour l'acidification du moût. Par contre, le deuxième diagramme constitue une innovation et nécessite non seulement l'extraction d'un moût clarifié non acidifié mais également l'inoculation simultanée de cultures de *Lact. fermentum* et de levure de l'espèce *S. cerevisiae* pour la co-fermentation. La fermentation contrôlée par inoculation de cultures starter a engendré une réduction du temps de fermentation. En effet, dans le procédé traditionnel, l'acidification naturelle du moût dure 12-16 h et la fermentation alcoolique du moût acidifié dure 9 - 12 h selon les sites (SAWADOGO-LINGANI *et al.*, 2007), soit une durée totale de 21 h - 48 h pour les deux fermentations. Un pH d'environ 3,5 - 3,8 est requis pour le moût final, pH favorable au développement des levures et à la fermentation alcoolique subséquente, et donnant le goût et l'acidité désirés au *dolo*. Neuf (9) heures de fermentation lactique contrôlée par inoculation à 1 % (v/v) d'inoculum de souches sélectionnées de *Lact. fermentum* ont été suffisantes pour atteindre ces pH, d'où une réduction du temps de fermentation de 3 - 7 h, soit 25 - 44 %. Par la co-fermentation, du *dolo* de caractéristiques comparables au *dolo* traditionnel a été produit en 12 h contre 21 - 48 h, durée des fermentations lactique naturelle et alcoolique dans le procédé traditionnel; il en résulte une réduction du temps de fermentation de 9 - 36 h, soit 43 - 75 %. Le temps mis pour la production du moût clarifié concentré et non acidifié utilisé comme substrat pour la co-fermentation devrait être pris en compte pour une meilleure appréciation de la réduction du temps de production. Des réductions du temps de fermentation dues à l'utilisation de cultures starter ont été rapportées par divers auteurs. Les résultats de brassage du *pito* nigérian expérimenté au laboratoire avec une culture mixte de *Lact. plantarum* et *Saccharomyces cerevisiae* ont indiqué une réduction du temps de fermentation de 2 jours (ORJI *et al.*, 2003). D'autre part, une réduction de 24 h du temps de fermentation de la pâte de maïs a été enregistrée lors de la production du kenkey avec une culture starter constituée de souches de *Lact. fermentum* et de *Saccharomyces cerevisiae* (HALM *et al.*, 1996). Récemment, du gowé béninois, un aliment fermenté à base de malt de sorgho, a été produit en 7 h de fermentation au lieu de 24 h (procédé traditionnel) avec *Lact. fermentum* seule ou en combinaison avec *Kluyveromyces marxianus* (VIÉRA-DALODÉ *et al.*, 2008).

Le présent travail est une première approche de l'utilisation de cultures starter dans la production du *dolo* et devrait être complété et approfondi par d'autres études ultérieures comme par exemple :

– la réalisation d'un scale-up de production en unité pilote avec l'application des bonnes pratiques d'hygiène (BPH) et des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), la caractérisation

technologique, physico-chimique et microbiologique des produits intermédiaires et des produits finis pour une parfaite maîtrise des deux diagrammes de production proposés ;

- la vulgarisation des diagrammes de production standardisés auprès des unités artisanales et/ou des promoteurs de nouvelles unités semi-industrielles de brassage du *dolo* ;
- l'étude de l'effet synergique de la combinaison de souches de *Lact. fermentum* sur la fermentation lactique et la qualité organoleptique du moût, de même que l'effet synergique de souches de levures sur la fermentation alcoolique et la qualité organoleptique du produit fini ;
- le développement des cultures starter lyophilisées ou déshydratées pour faciliter leur utilisation et manutention par les utilisateurs.

## Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce aux financements de la coopération danoise « Danish International Development Assistance (DANIDA) ». Les auteurs remercient mesdames Maïmounata Congo, Marie Solange Somda et Rosalia Méda pour leur assistance technique.

## Références citées

**ACHI O.K., 2005.** The potential for upgrading traditional fermented foods through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* (4) 375-380.

**GOBETTI M., CORSETTI A. and ROSSI J., 1994.** The sourdough microflora. Interaction between lactic acid bacteria and yeast: metabolism of carbohydrates. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* (41) 456-460.

**GUIRAUD J. P. 1998.** *Microbiologie Alimentaire*. DUNOD, Paris. France. pp 310-321.

**GLOVER R. L. K., ABAIDOO R. C., JAKOBSEN M. and JESPERSEN L., 2005.** Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from a survey of pito production sites in various parts of Ghana. *Systematic and Applied Microbiology* (28) 755-761.

**HAGGBLADE S. and HOLZAPFEL W. H., 1989.** Industrialization of Africa's indigenous beer brewing. In: « Industrialization of Indigenous Fermented Foods », K. H. Steinkraus, Marcel / Dekker, New York. pages 191-283.

**HALM M., OSEI-YAW A., HAYFORD A., KPODO K. A. and AMOA-AWUA W.K.A., 1996.** Experiences with the use of a starter culture in the fermentation of maize for « kenkey » production in Ghana. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (12) 531-536.

**HAMMES W.P., WEISS N. and HOLZAPFEL W.P., 1992.** The genera *Lactobacillus* and *Carbobacterium*. In: « The prokaryotes. A hand-book on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Application », A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.H. Schleifer, Springer-Verlag, New York. pages 1535-1594.

**HOLZAPFEL W. H., 2002.** Appropriated starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* (75) 197-212.

**HULSE J.H., LAING E.M. and PEARSON O.E., 1980.** Sorghum and the millets: their composition and nutritive value. Academic Press, New York, 997 p.

**KIMARYO V.M., MASSAWE G.A., OLASUPO N. A., HOLZAPFEL W.H., 2000.** The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of « Kivunde », a traditional Tanzanian food product. *International of Food Microbiology* (56) 179-190.

**MILLER G.L., 1956.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* (31) 426-428.

**MOTARJEMI Y., 2002.** Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* (75) 213-229.

- MUGULA J.K., NAWHUS J.A., SORHAUG T., 2003.** Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of togwa, a Tanzanian fermented food. *International Journal of Food Microbiology* (83) 307-318.
- NF V03-050 1970.** Produits agricoles alimentaires - Directive générale pour le dosage de l'azote avec minéralisation selon la méthode de Kjeldahl.
- NF V03-707 2000.** Céréales et produits céréaliers - Détermination de la teneur en eau - Méthodes de référence pratique.
- NF V03-760 1981.** Céréales, légumineuses et produits dérivés Détermination des centres - Méthode par incinération à 550°C.
- NOVELLIE L., 1977.** Beverages from sorghum and millets. In : « Proceeding of a Symposium on sorghum and Millets for Human Food » D.A.V. Dendy, *Tropical Products Institute*, London, pages 73-77.
- OFUYA C.O., NNAJIAFOR C., 1989.** Development and evaluation of a starter culture for the industrial production of gari. *Journal of Applied Bacteriology* (66) 37-42.
- ORJI M.U., MBATA T.I., ANICHE G.N. and AHONKHAI I., 2003.** The used of starter cultures to produce « Pito », a Nigerian fermented alcoholic beverage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (19)733-736.
- OYEWOLE O.B., 1990.** Optimization of cassava fermentation for fufu production: effect of single starter cultures. *Journal of Applied Bacteriology* (68) 49-54.
- ROLLE R. and SATIN M. 2002.** Basic requirements for the transfer of fermentation technologies to developing countries. *International Journal of Food Microbiology* (75) 181-187.
- RUBAYIZA M., 1998.** Développement de la valeur dans les filières sorgho et manioc par production de bières et sirops, et par valorisation alimentaire des drêches. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, INPL Nancy, France, 149 p.
- SANNI A. I., 1993.** The need for process optimization of African fermented foods and beverages. *International Journal of Food Microbiology* (18) 85-95.
- SAWADOGO-LINGANI H., LEI V., DIAWARA B., NIELSEN D. S., MØLLER P.L., TRAORÉ A.S. and JAKOBSEN M., 2007.** The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort, for production of sorghum beer. *Journal of Applied Microbiology* (103) 765-777.
- SAWADOGO-LINGANI H., DIAWARA B., A.S. TRAORÉ A.S. and JAKOBSEN M., 2008.** Technological properties of *Lactobacillus fermentum* involved in the processing of dolo and pito, West African sorghum beers, for the selection of starter cultures. *Journal of Applied Microbiology* (104) 873-882.
- SULMA I., LARRY R. S. and KIRLEIS A., 1991.** Isolation and characterisation of microorganisms associated with the traditional sorghum fermentation for production of Sudanese kirsra. *Journal of Applied Environmental Microbiology* (57) 2529-2533.
- VAN DER AA KÜHLE A., JESPERSEN, L., GLOVER, R.L.K., DIAWARA, B. and JAKOBSEN, M. 2001.** Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer. *Yeasts* (18) 1069-1079.
- VIÉRA-DALODÉ G., MADODÉ Y. E., HOUHOUGAN J., JESPERSEN L. and JAKOBSEN M. 2008.** Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeast as inoculum enrichment for the production of gowé, a sour beverage from Benin African *Journal of Microbiology Research* (2) 179-186.
- YAO A.K., KADIO G., COULYBALY A. et AGBO G.Z., 1995.** Production du « Tchapalo » à partir du sorgho en Côte d'Ivoire. In: « Processing and industrial utilization of sorghum and related cereals in Africa. » J. M. Menyonga, T. Bezuneh, C.C. Nwasike, P.M. Sedogo & A. Tenkouano, OUA/CSTR-SAFGRAD, AICD, Ouagadougou, Burkina Faso, pages 55-60.