

Etude de la Dynamique de la Flore Microbienne Isolée de la Purée en Fermentation Destinée à la Distillation de Lotoko

TABU wa BOMESI Ernest^{1*}, VAWAZOLA NSIMAKETO Victor Héritier, KIMBEMUKEN THASUR Eric, FEZA KAMARI Angélique, SIFA KWA MUNGU Daniel-Bienvenu

Paper History

Received : March 07, 2022

Revised : September 12, 2022

Accepted : November 01, 2022

Published : November 27, 2022

Keywords

Lotoko; Mash; fermentation; Enterobacteriaceae; Fungal flora; Lactic flora ; Total germs.

ABSTRACT

Dynamic study of the Microbial Flora Isolated from the Fermentation Mash Intended for Lotoko Distillation

Lotoko drink, an alcoholic drink accessible for all budgets, is obtained by distillation of mash, having as raw material, cassava chips and corn, under spontaneous fermentation.

The aim of this study is to enumerate microflora isolated from fermenting mash. Hence, the counting of microbial groups as well as their microscopic description were carried out according to the classic methods of food microbiology. Analysis carried out on three samples of mash in fermentation show the presence of a complex microflora whose number of cells per gram of mash to spontaneous fermentation evolves differently from the beginning to the end of the process. The number of total mesophilic aerobic flora (or total germs) and that of fungal flora increase during fermentation while the number of Enterobacteriaceae and that of lactic flora, associated with yeasts, decrease. The spontaneous fermentation of the Lotoko mash results from the metabolism of this complex microflora.

Faculté des Sciences Agronomiques, Université de Kinshasa, BP 117 Kinshasa XI,

*Corresponding author, Email: tabuernest@gmail.com

INTRODUCTION

Les boissons fermentées et distillées ont toujours joué un rôle important dans la plupart des sociétés du monde depuis des temps anciens par leur rôle unique de jouissance et d'équilibre ainsi que par leur importance économique en apportant un revenu intéressant aux acteurs de la filière [LEGRAS et al., 2007]. L'alcool qui caractérise la plupart de ces boissons est le résultat du métabolisme de la levure qui convertit préférentiellement les sucres fermentescibles en éthanol, composé chimique recherché par les consommateurs de ces boissons et en dioxyde de carbone [POWELL et al., 2003 ; KUMARI et al., 2015 ; SANTANU et al., 2020].

En République Démocratique du Congo (RDC), la fabrication de la boisson traditionnelle alcoolisée distillée appelée Lotoko est largement répandue et utilisée, comme matière première, le manioc et le maïs [DIAKABANA et al., 2017]. Cette boisson est obtenue par distillation de la purée ayant subi une fermentation spontanée. La purée est préparée

par malaxage de la pâte de manioc et de la farine du malt de maïs. La pâte de manioc est issue du chauffage de la farine de manioc avec le résidu liquide de la distillation de la purée précédente.

Généralement, toute matière première s'accompagne de la flore microbienne. La matière première pour l'élaboration de Lotoko est constituée principalement de l'amidon qui est un polymère de glucose. Le processus de fermentation nécessite une hydrolyse (ou conversion) préalable de l'amidon en sucres fermentescibles assimilables par les microorganismes ; cette hydrolyse est réalisée par des enzymes, spécialement les amylases, provenant soit des microorganismes, soit du maltage. Ces enzymes sont alors impliquées dans le processus de brassage comprenant l'empesage, la liquéfaction et la saccharification de l'amidon [ALAIS et LINDEN, 1997 ; KUNZE, 2019 ; CHAVEZ-LOPEZ et al., 2020].

L'activité de ces enzymes implique la maîtrise de plusieurs paramètres technologiques, entre autres la concentration du substrat, la tolérance à l'éthanol, la pression osmotique, la

disponibilité des nutriments, la température et le pH pour une hydrolyse optimale de l'amidon en sucres fermentescibles [REED and al, 1991 ; KUNZE, 2019].

La fabrication de Lotoko reste encore un procédé empirique ; le savoir ancestral qui a conduit à l'émergence de cette boisson n'est pas formalisé ; ce savoir ancestral a conduit à des pratiques qui prennent en compte certaines contraintes technologiques pour permettre les activités enzymatique et microbienne nécessaires au process. Le constat est qu'il y a déficit de l'information sur l'implication de la diversité de la flore microbienne dans ce processus d'élaboration de Lotoko.

Le présent travail vise à étudier la dynamique de la flore microbienne isolée de la purée en fermentation destinée à la distillation de Lotoko ainsi que leur description microscopique.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Le matériel du présent travail est constitué de six échantillons de purées destinées à la fabrication de Lotoko, obtenus auprès de trois productrices artisanales, soit deux échantillons par productrice dont l'un prélevé en début fermentation et l'autre en fin fermentation.

Méthodes

Préparation des inocula, Ensemencement et Incubation

Dans les conditions aseptiques, un volume pesant 22,1 g de chaque échantillon de purée (du début fermentation (DF) ou de la fin fermentation (FF)) a été ramené à 40 ml par ajout d'eau distillée stérile pour diminuer la viscosité de la purée et faciliter son prélèvement avec la pipette. Le mélange issu de la dilution a été soumis à une série des dilutions décimales jusqu'à 10⁻⁶.

Un millilitre de différentes dilutions a été ensemencé par incorporation dans différentes boîtes de Pétri en milieux :

- Nutrient Agar ou gélose nutritive (Lot 012319503, Ref 610036, Liofilchem, Italie) incubée pendant 48 heures à 37° C pour le dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux ou germes totaux ;

- Gélose de MacConkey (Lot 090419502, Ref 610028, Liofilchem, Italie) incubée pendant 48 heures à 37° C pour le dénombrement des entérobactéries totales ;

- Gélose de M.R.S (Cat : 1043.00, Conda, Espagne) incubée dans une jarre d'anaérobiose sous atmosphère enrichie en CO₂ pendant 72 heures à la température ambiante pour la recherche de la flore lactique ;

- Gélose de Sabouraud dextrose 4% (Lot 091019503, Ref 610103, Liofilchem, Italie) incubée pendant 72 heures à la température ambiante pour la recherche de la flore fongique [DAHOUENON-AHOUSSE et al., 2012 ; NDIAYE et al., 2015 ; DEGNON et al., 2016 ; VAWAZOLA et al., 2018].

Dénombrement de la flore microbienne

Le dénombrement a été fait par comptage direct des colonies formées sur les différentes boîtes de Pétri contenant les différents milieux de culture tout en déduisant les Unités formant colonies (UFC) par millilitre. Le nombre de germes par gramme d'échantillon de purée a été obtenu en multipliant la valeur des UFC obtenues par 1,81.

Description des caractères culturels et microscopiques

Les colonies caractéristiques formées sur la gélose de MacConkey, la gélose MRS et la gélose de Sabouraud dextrose 4% ont été soumises à une description macroscopique (caractères culturels) et microscopique (coloration de Gram, coloration au bleu de lactophénol, mode de division cellulaire).

RESULTATS

Dénombrement de la flore microbienne

Après les temps d'incubation aux températures appropriées, les colonies développées sur les différents milieux de culture ont été comptées ; les UFC par millilitre de purée et le nombre de germes développés sur différents milieux de culture ont été calculés. Les Tableaux 1, 2 et 3 suivants donnent le nombre de germes par gramme de deux échantillons de purée (en début fermentation et en fin fermentation) récoltés auprès de trois productrices artisanales de boissons Lotoko.

Tableau 1. Nombre de germes par gramme de deux échantillons de purée récoltés auprès de la productrice 1

Flore	Début fermentation (Germes.g-1)	Fin fermentation (Germes.g-1)
Germes totaux	232*10 ⁴	186*10 ⁶
Entérobactéries	62*10 ⁴	60*10 ³
Flore lactique	190*10 ⁶	67*10 ⁴
Flore fongique	58*10 ⁴	89*10 ⁵

Tableau 2. Nombre de germes par gramme de deux échantillons de purée récoltés auprès de la productrice 2

Flore	Début fermentation (Germes.g-1)	Fin fermentation (Germes.g-1)
Germes totaux	293*10 ⁴	> 543*10 ⁶
Entérobactéries	261*10 ³	259*10 ²
Flore lactique	295*10 ⁵	58*10 ⁴
Flore fongique	98*10 ⁴	63*10 ⁵

Description des caractères cultureux et microscopiques

L'observation des caractères cultureux et microscopiques des microorganismes développés sur différents milieux de cultures a permis de différencier 2, 3 ou 4 types morphologiques comme le désigne le Tableau 2, le Tableau 3 et le Tableau 4.

Tableau 3. Nombre de germes par gramme de deux échantillons de purée récoltés auprès de la productrice 3

Flore	Début fermentation (Germes.g-1)	Fin fermentation (Germes.g-1)
Germes totaux	107*10 ⁵	427*10 ⁶
Entérobactéries	94*10 ⁴	277*10 ³
Flore lactique	123*10 ⁵	112*10 ⁴
Flore fongique	98*10 ⁵	83*10 ⁶

Tableau 4. Caractères cultureux et microscopiques de quelques colonies caractéristiques formées sur la gélose de MacConkey

Co de colonie	Caractères cultureux	Caractères microscopiques
ET 01	Colonies rouges circulaires, bombées, brillantes, opaques, blanchâtres à surface lisse	Bacilles Gram négatif
ET 02	Colonies jaunes circulaires, bombés, grasses, luisantes, très muqueuses	Bacilles Gram négatif

Tableau 5. Caractères cultureux et microscopiques de quelques colonies caractéristiques formées sur la gélose MRS

Cod e colonie	Caractères cultureux	Caractères microscopiques
LaB. S	Colonies blanches, circulaires et opaques	Cellules ovales ou ovoïdes
	Colonies punctiformes, blanches, brillantes et opaques	Bacilles à Gram positifs
LaB. L	Colonies blanchâtres, rugueuses et bombées	Bacilles à Gram positifs

DISCUSSION

La flore microbienne qui colonise la purée en fermentation destinée à la fabrication de la boisson Lotoko est très diversifiée,

faisant d'elle des acteurs principaux de ce processus. Le présent travail montre la colonisation de la purée par une flore aérobie mésophile totale, une flore des Entérobactéries (Tableau 4), une flore lactique associée aux levures (Tableau 5) et une flore fongique (Tableau 6), pouvant être impliquées dans la fermentation de la purée de Lotoko.

BOKASSA et al. [2013] ont rapporté la présence de germes totaux, de levures et de moisissures ainsi que de bactéries lactiques dans la pâte de production de Gowé, une boisson traditionnelle à base de maïs fabriquée au Bénin. VAWAZOLA et al. [2018] ont constaté l'implication de ces mêmes microorganismes dans le phénomène de maturation de la boisson Tangawisi. Selon THONART et al. [2009], les bactéries lactiques et les levures sont les micro-organismes dominants généralement rencontrés dans la plupart des produits fermentés à base de céréales et de manioc. Pour EWUOSO et al. [2020], les fermentations naturelles sont réalisées par des levures et des bactéries lactiques formant un microbiote complexe qui agit en coopération.

Tableau 6. Caractères cultureux et microscopiques de quelques colonies caractéristiques formées sur la gélose de Sabouraud dextrose 4%

Co de Colonie	Caractères cultureux	Caractères microscopiques
Fl. FSa	Colonies transparentes, circulaires muqueuses	Cellules ovales et sphériques Multiplication par bourgeonnement : <i>Saccharomyces sp</i>
	Colonies jaunâtres au centre blanchâtre, et jaunâtre au revers de la boîte de Pétri	Cellules ovoïdes se multipliant par bourgeonnement : <i>Saccharomyces sp</i>
Fl. FSc	Colonies blanches, circulaires, opaques et mattes	Cellules allongées et elliptiques Multiplication par scissiparité : <i>Schizosaccharomyces sp</i>
Fl. FAs	Colonies plates formées de courts filaments aériens blancs Colonies souvent poudreuses ou granuleuses Colonies de coloration verdâtre	Mycélium non cloisonné, la tête porte de conidiophores, phialides formées sur la vésicule. Mycélium non cloisonné, la tête de la conidie est ronde: <i>Aspergillus sp</i>
Fl. FPe	Petites colonies plates, formées de courts filaments aériens,	Thalle, Pénicilles, Spores ; Organisation en pinceau <i>Penicillium sp</i>

	habituellement blancs.	
	Coloration verdâtre	
	Colonies floconneuses	

La présence de tous ces microorganismes dans la présence de Lotoko en fermentation n'est pas un fait du hasard. L'élaboration de Lotoko se fait dans les conditions artisanales où aucun paramètre technologique de production influençant la fermentation n'est contrôlé. L'augmentation des effectifs de germes totaux et de la flore fongique (Tableaux 1, 2 et 3) est signe de la dégradation avancée du substrat, constitué essentiellement de l'amidon [KUNZE, 2019]. Ces microorganismes, spécialement du genre *Aspergillus*, libèrent les enzymes amylolytiques qui dégradent l'amidon en glucose. Ce dernier est utilisé par tous les microorganismes pour la production de l'énergie et de divers métabolites primaires. Les Entérobactéries, responsables des fermentations « acides mixtes », concourent à la formation d'une série de métabolites [GÄNZLE and SEKWATI-MONANG, 2011]. Il sied de souligner que généralement les levures et des bactéries lactiques réalisent les fermentations naturelles impliquant la formation de produits nouveaux : la levure joue un rôle de premier plan dans la production d'alcool et de gaz carbonique, en raison de sa capacité à accumuler des niveaux élevés d'éthanol et à induire l'anaérobiose, et dans la production de composés aromatiques hautement souhaitables, mais les bactéries lactiques sont particulièrement importantes car elles produisent des acides, des composés aromatiques et des peptides souhaitables qui inhibent la croissance des microorganismes indésirables [FARIA-OLIVEIRA et al., 2015 ; BURATTI and BENEDETTI, 2016].

Les modifications de la composition de la purée en fermentation induites par l'action métabolique vont empêcher ou supprimer certains champignons microscopiques filamenteux et les bactéries associées à la détérioration des aliments [JUILLARD et al., 1987 ; MENSAH et al., 1991], ce qui justifie la diminution des Entérobactéries et de la flore lactique (Tableaux 1, 2 et 3) [JEHANNO et LE GUERN, 1997 ; STEINKRAUS, 2002 ; GÄNZLE and SEKWATI-MONANG, 2011].

La différence relative de ces groupes microbiens en début et fin fermentation de la purée est due à la capacité des uns et des autres de s'adapter aux nouveaux métabolites élaborés à travers les diverses voies métaboliques de tous les microorganismes présents dans la purée.

La source de cette microflore est probablement la matière première utilisée dans la fabrication de la purée de Lotoko et les ustensiles de travail. En effet, considérant la qualité microbiologique de la matière première, constituée des cossettes de manioc et des grains de maïs, elle est colonisée par les microorganismes : la fermentation (rouissage) du manioc

laisse dans les cossettes une flore importante [DEGNON et al., 2018], il en est de même du maltage de grains de maïs qui occasionne une prolifération microbienne [BOKULICH and BAMFORTH, 2013 ; DIAKABANA et al., 2017]. Les ustensiles de l'industrie locale utilisées, comme réacteur ou fermenteur, ne bénéficient d'aucun soin particulier après le travail et constituent, de ce fait, des points de contamination de microorganismes du milieu environnant qui y trouvent des conditions favorables pour leurs proliférations et peuvent être ainsi à la base de la fermentation spontanée [HEARLD and FLEET, 1985 ; WAITES et al., 2001 ; VAWAZOLA et al., 2018].

La fermentation de la purée pour la distillation de Lotoko est un processus biochimique complexe de « conversion (hydrolyse) et fermentation combinée » mettant en interaction une diversité microbienne comprenant les levures, les bactéries et les moisissures [HEARD et FLEET, 1985].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALAI S., LINDEN G. [1997]. Abrégé de Biochimie alimentaire. 4^e édition révisée et complétée. Masson. Paris. 248 pages.
- BOKULICH N.A., BAMFORTH C.W. [2013]. The Microbiology of Malting and Brewing. Microbiology and Molecular; 7, 2, 157–172.
- JEHANNO D., LE GUERN J. [1997]. Les légumes fermentés. 2^e partie ; Pp 183-199. In BOURGEOIS C.M. et LARPENT J.P. : Microbiologie alimentaire. Tome2 : Aliments fermentés et Fermentations alimentaires. 2^e édition. Collection Sciences & Techniques agroalimentaires.
- BURATTI S., BENEDETTI S. [2016]. Fermentation alcoolique utilisant le nez électronique et la langue électronique. Academic Press. Electronic Noses and Tongues in Food Science, Page 291 – 299.
- BOKASSA Y., TCHEKESSI C.K., BANON J., et al. [2013]. Caractérisations physico-chimiques et microbiologiques d'une pâte traditionnelle "gowé" fabriquée à base de maïs au Bénin. J. Rech. Sci. Univ. Lomé (Togo), Série A, 15,2, 377-387.
- CHAVEZ-LOPEZ C., SERIO A., ROSSI C., MAGGIO F., PAPARELLA A. [2020]. Changes occurring in spontaneous maize fermentation : An overview. Fermentation, 6, 36 :
- DAHOUENON-AHOUSSE E., DEGNON R.G., ADJOU E.S., DOMINIQUE C.K.S. [2012]. Stabilisation de la bière produite à partir de matières amylacées locales (*Sorghum bicolor* et *Musa acuminata*) par adjonction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*. Journal of Applied Biosciences 51, 3596 – 3607.
- DEGNON G.R., ADJOU E.S., METOME G., DAHOUENON-AHOUSSE E. [2016]. Efficacité des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* et de *Mentha piperita* dans la stabilisation du lait frais de vache au Sud du Bénin. Int. J. Biol. Chem. Sci. 10,4, 1894-1902.
- DEGNON R.G., KONFO C.T.R., ADJOU E.S., DAHOUENON-AHOUSSE E. [2018]. Evaluation des conditions de production, de la qualité physico-chimique et microbiologique des cossettes de manioc dans la commune de Bassila (Nord-Bénin). Université d'Abomey-calavi, Ecole polytechnique d'Abomey-calavi, Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie appliquée. Cotonou Bénin. Pp 1530-1532.
- DIAKABANA P., DZONDO M.G., MOUSSOUNGA J.E., SAMPILA T.A.W.G., MADIELE M.A.B., MESSO L. KOBAWILA S.C., LOUEMBE D. [2017]. Behavior of Grains in the Course of the Smothering Phase of the Traditional Process of Malting of Corn (*Zea mays* sp.) in the

Production of Lotoko, a Brandy of the Basin of Congo. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6, 11, 3541-3551.

EWUOSO M.O., ANIMASHAUN O.H., ADEDAPO A., ADEJUMO A.A. [2020]. Lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously fermented sorghum sourdough. *American Journal of Microbiological Research*, 8, 2, 63-72.

FARIA-OLIVEIRA F., DINIZ R.H.Z., GODOY-SANTOS F., PILO F.B., IESO M., CASTRO I.M., BRANDÃO R.L. [2015]. The role of yeast and lactic acid bacteria in the production of fermented beverages in South America. *Food production and Industry*. 107-135.

GÄNZLE M.G., SEKWATI-MONANG B. [2011]. Microbiological and chemistry characterisation of ting, a sorghum-based sourdough product from Botswana. *International Journal of Food Microbiology* 150, 115-121.

HEARLD G.M., FLEET G.H. [1985]. Growth of natural yeast during the fermentation of inoculated wine. *Applied and Environmental Microbiology*. 50, 3. 727 – 728.

JUILLARD V., SPINNLER H.E., DES MAZEAUD M.J., BOQUIEN C-Y. [1987]. Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Le Lait*, INRA Editions, 67 2, 149-172.

KUMARI S., GULERIA P., DANGI N. [2015]. Cereal Based Beverages and Fermented Foods: A Review. *International Journal of Enhanced Research in Science, Technology & Engineering*. ISSN: 2319-7463, Vol. 4 Issue 10.

KUNZE W. [2019]. *Technology, Brewing and Malting*. 6th English edition. VLB Berlin. ISBN 978-3-921690-87-1. 948 Pages.

LEGRAS J.L., MERDINOGLU D., CORNUET J.M., et al. [2007]. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology* 16, 10, 2091–2102.

MENSAH P., TOMKINS A.M., DRASAR B.S., HARRISON T.J. [1991]. Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *Journal Applied of Bactériology*, 70, 203-210.

NDIAYE N.A., DIENG M., KANE A., CISSE M., MONTET D., TOURE N.C. [2015]. Diagnostic et caractérisation microbiologique des procédés artisanaux de fabrication de boissons et de concentrés d'*Hibiscus sabdariffa* L au Sénégal. *Afrique SCIENCE* 11, 3, 197 – 210.

POWELL C.D., QUAIN D.E., SMART K.A. [2003]. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Research*, 3, 2, 149–157.

REED G. and NAGODAWITHANA T.W. [1991]. *Yeast technology*. Second Edition. Van Nostrand Reinhold New York. ISBN 978-94-011-9773-1 ISBN 978-94-011-9771-7 (eBook). Pages 445.

THONART P., YAO A.A., EGOUNLETY M., KOUAME L.P. [2009]. Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest : leur utilisation actuelle. *Annales de Medecine Vétérinaire*, 153, 54-65.

SANTANU M., SANJIB K.P., JOLVIS POU K.R. [2020]. *Biotechnological Interventions in Beverage Production*. *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*. Volume 19, *The Science of Beverages*, 1-37.

STEINKRAUS. [2002]. Fermentations in world food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1, 1, 23-32.

VAWAZOLA N.V.H., TSHIENDESHA K. C., NTUMBA D., KILEMBA N., MASIMANGO N. J.-T. [2018]. Qualité hygiénique des boissons Tangawisi fabriquées et vendues à Kinshasa et perspectives de leur amélioration. *Congosciences*, 6, 3, 150-155.

WAITES M.J., MORGAN N.L., ROCKEY J.S., HIGTON G. [2001]. *Industrial Microbiology: An Introduction*. *The Quarterly Review of Biology*. 78, 1. 264 pages.

 This work is in open access, licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>