

**CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE
DU « KPÈTÈ-KPÈTÈ » UN FERMENT DES BIÈRES TRADITIONNELLES
PRODUITES AU BÉNIN.**

*C. NTCHA**, *G. VIEIRA-DALODE****, *B. P. AGBOBATINKPO***, *A. P. P. KAYODE***, *A. D. ADEYEMI***, *J. T. C. CODJIA***** & *L. BABA-MOUSSA**

**Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie; Faculté des Sciences et Techniques/Université d'Abomey-Calavi. Email : laminesaid@yahoo.fr*

***Laboratoire de Valorisation et de Gestion de la Qualité de Bio ingrédients Alimentaires. Faculté des Sciences Agronomiques/ (LaBio), DNSA/FSA, Université d'Abomey-Calavi*

****Laboratoire de Physico-chimie des Aliments Faculté des Sciences Agronomiques/Université d'Abomey-Calavi*

*****Laboratoire de recherche en Ecologie Animale et Zoogéographie Faculté des Sciences Agronomiques/Université d'Abomey-Calavi*

ABSTRACT

The study aims to carry out the physico-chemical parameters and to isolate different species of microorganisms contained in the starter "*kpètè-kpètè*" to promote these residues beers that are real sources of probiotic microorganisms. A field survey was conducted on 45 producers in the southern and northern parts of Benin. A total of 45 samples of wet starter were collected. Microbiological and physico-chemical analysis show that there is a great variability among the parameters considered, except pH which is relatively the same for all samples. The starter *kpètè-kpètè* has the following average characteristics: pH = 4.03 ; Tribal Acidity = 0.14 mg /g ; Dry Matter=7.31 % ; the load in Logcfu of lactic acid bacteria = 6.42, Yeasts and Moulds = 6.2 ; and Streptococci =3.84. Lactic acid bacteria and yeasts and moulds are less present in the wet ferment than in the beer itself (Lactic acid bacteria = 7, 9; yeasts and moulds = 8, 5). A significant difference ($p < 5\%$) of pH, brix and count of lactic bacteria has been observed between the starter of the different studied zones.

The study identified the different types of yeast and lactic bacteria used to produce the Beninese traditional beer. Microbiological and physico-chemical quality of enzymes is known and the ferments are classified according to these parameters. The control of physico-chemical and microbiological data of starter culture offer a new opportunities for technology upgrading and products development in starter culture production. Identification of micro-organism enable best control of fermentation of traditional beer.

Keywords: starter, traditional beer, physical chemistry, microorganisms, probiotic properties

PHYSICO-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF KPÈTÈ-KPÈTÈ™ A STARTER OF TRADITIONAL BEER PRODUCED IN BENIN

RÉSUMÉ

L'objectif de l'étude est d'évaluer les paramètres physico-chimiques et d'isoler les différents groupes de microorganismes contenus dans les ferments « *kpètè-kpètè* » afin de valoriser ces résidus de bières qui constituent de véritables sources de microorganismes probiotiques. Une enquête de terrain a été réalisée auprès de 45 productrices dans les localités méridionales et septentrionales du Bénin. Quarante-cinq (45) échantillons de ferments de type humide ont été collectés. Les analyses Microbiologique et physico-chimique des ferments ont révélés l'existence d'une grande variabilité entre les paramètres considérés à l'exception du pH qui restait le même pour tous les échantillons. Les ferments présentent les caractéristiques moyennes suivantes : pH = 4,03, Acidité Tribale = 0,14 mg/g d'échantillon, Taux de Matière Sèche = 7,31 % et les charges en Log ufc des bactéries lactiques = 6,42, des Levures et Moisissures = 6,2, et des Streptocoques = 3,84. Les bactéries lactiques et les levures et moisissures sont moins présentes dans le ferment humide que dans la bière elle-même (bactéries lactiques = 7,9; levures moisissures = 8,5). Une différence significative ($p < 5\%$) de pH, du °Brix et de charge en bactéries lactiques a été observée entre les ferments des différentes zones étudiées. La qualité microbiologique et physico-chimique des ferments est également connue et les ferments sont classifiés selon ces paramètres. La maîtrise des données physico-chimique et microbiologique des ferments offre de nouvelles opportunités pour l'amélioration des technologies et le développement de la production du *kpètè-kpètè*. L'identification des espèces permet un meilleur contrôle de la fermentation des bières traditionnelles béninoises.

Mots clés : ferment, physico-chimie, microorganismes, propriétés probiotiques.

INTRODUCTION

Les céréales d'importance stratégique pour la sécurité alimentaire en zone tropicale sont le millet, le sorgho, le riz et le maïs (FAO 2012). En Afrique, ces céréales sont transformées en divers produits dont les boissons fermentées. Le sorgho est souvent la céréale la plus utilisée pour la fabrication des boissons fermentées comme les bières opaques (Kühle *et al.*, 2001). Au Bénin, le sorgho occupe le second rang dans la production céréalière du pays après le maïs (FAO/STAT, 2012). Il est plus cultivé au Nord que dans les autres parties du pays (référence). La plus grande partie de la production est assurée par les groupes sociaux Bariba, Yom, Peulh et Lokpa (Missihoun *et al.*, 2012). Le « *tchoukoutou* et le *tchakpalo* » sont des bières traditionnelles principalement produites avec du sorgho et vendues comme aliment de rue (Kayodé *et al.*, 2006). En effet, le « *tchoukoutou* et le *tchakpalo* », ont des fonctions sociales importantes telles que l'esprit coopératif et restent des boissons ancestrales utilisées largement pour les cérémonies traditionnelles surtout au centre et au nord du pays. La production du *tchoukoutou* est généralement caractérisée par trois phases: le maltage du sorgho, le brassage du malt de sorgho et la fermentation du moût (Kayodé *et al.*, 2006). La fermentation constitue l'étape la plus importante

et présente de nombreux avantages tels que la réduction des risques de développement des microorganismes pathogènes, la dégradation de certains facteurs antinutritionnels (phytates, α -galactosides), le développement des qualités organoleptiques spécifiques par synthèse d'acides organiques et d'arômes (Nout1994 ; Nout & Sarkar, 1999). La fermentation du *tchoukoutou* est assurée par l'ajout d'un ferment obtenu lors d'une production antérieure de la bière. Le ferment traditionnel «*kpètè-kpètè*» (en langue locale *bariba*) serait le plus utilisé pour la fermentation de la bière locale, (Hounhouigan *et al.*, 2007). Ce ferment est dominé par des bactéries et les levures et autres microorganismes non encore identifiés (Kayodé *et al.*, 2006). Les microorganismes impliqués dans la fermentation des bières opaques de certains pays africains ont été investigués (Van der Aa Kühle *et al.*, 2001) ; (Sanni *et al.*, 1993) ; (Sefa-Deheh *et al.*, 1999). Les indices de la qualité de la boisson produite à base de *Saccharomyces cerevisiae* sont comparables au produit issu du ferment traditionnel (Sefa-Deheh *et al.*, 1999). Cependant, les espèces isolées et leur fréquence de distribution varient d'une région à une autre et selon les ingrédients utilisés. Mugula *et al.* (2003) ont identifié les bactéries lactiques telles que *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus pentosaceus*) et les levures (*Candida pelliculosa*, *Candida tropicalis*, *Issatchenkia orientalis* et *Saccharomyces cerevisiae*) du ferment de *togwa*, une bière locale de la Tanzanie. Peu d'information existe sur la biodiversité des microorganismes fonctionnels contenus dans les ferments des bières traditionnelle du Bénin notamment sur les espèces de bactéries et de levures. Kayodé *et al.* (2012) ont rapporté que le ferment du *tchoukoutou* a une activité probiotique, biologiquement stable et qui peut lutter contre les infections opportunistes induites par les microorganismes pathogènes Les principaux microorganismes probiotiques connus à ce jour sont des bactéries (*Lactobacilles*, *Bifidobactéries*, *Propionibactéries*, *Entérocoques* etc. et certaines levures du genre *Saccharomyces*, (Mercenier *et al.* (2002). Ces différentes études ont été confirmées par les travaux de Blandino *et al.*, (2003), qui affirmaient que les bactéries lactiques et levures présentes dans les aliments fermentés à base de céréales sont actuellement utilisées pour la formulation de nouveaux produits probiotiques. Les résidus de *tchoukoutou* constitueraient donc un ingrédient utile dans la formulation de produits probiotiques. Cette formulation de produits probiotiques ne serait possible sans une connaissance bien approfondie de la microflore du ferment et de ces paramètres physico-chimiques.

Les aspects physico-chimiques et microbiologiques sont donc à évaluer car peu de travaux se sont appesanties sur les techniques de productions et la caractérisation du *kpètè-kpètè* alors que ce produit a un grand potentiel en matière de microflore fonctionnelle (Kayodé *et al.*, 2012 ; Houndonougbo *et al.*, 2011). Une meilleure connaissance et un meilleur contrôle des techniques de production de ce produit est capital. La caractérisation des résidus du *tchoukoutou/ tchakpalo* s'impose afin de maîtriser la fermentation des bières locales. L'évaluation des paramètres physico-chimique et microbiologique du « *kpètè-kpètè* » contribue à enrichir le répertoire de la microflore des aliments béninois.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Zones d'étude

L'étude a été conduite dans les zones centre et nord du Bénin et précisément dans trois départements : Atacora, Borgou et Collines. Trois villes ont été identifiées par département : Natitingou, Boukoubé et Tanguéta dans l'Atacora ; Parakou, Tchaourou et N'Dali dans le Borgou ; Bantè, Dassa et Glazoué dans les Collines (Figure 1)

Collecte des échantillons

Les zones d'étude ont été sectionnées en tenant compte de la grande consommation des bières traditionnelles au Bénin. Au total, quarante-cinq (45) productrices ont été sélectionnées au hasard et quarante-cinq (45) échantillons ont été collectés dans les trois départements parcourus à raison de quinze 15 échantillons par département et cinq(5) par ville (Tableau 1). Deux (2) échantillons de ferment ont été prélevés en surface et en profondeur des bassines ou des jarres auprès de chaque productrice. Les deux (2) échantillons ont été ensuite mélangés et ainsi, 250 ml de ferment ont été recueilli auprès de chaque productrice, dans des sachets STOMACHER, puis gardés dans des glacières contenant des cristaux de glace. Ils ont été transportés au laboratoire puis conservés à 4°C pour des analyses physico-chimiques et microbiologiques.

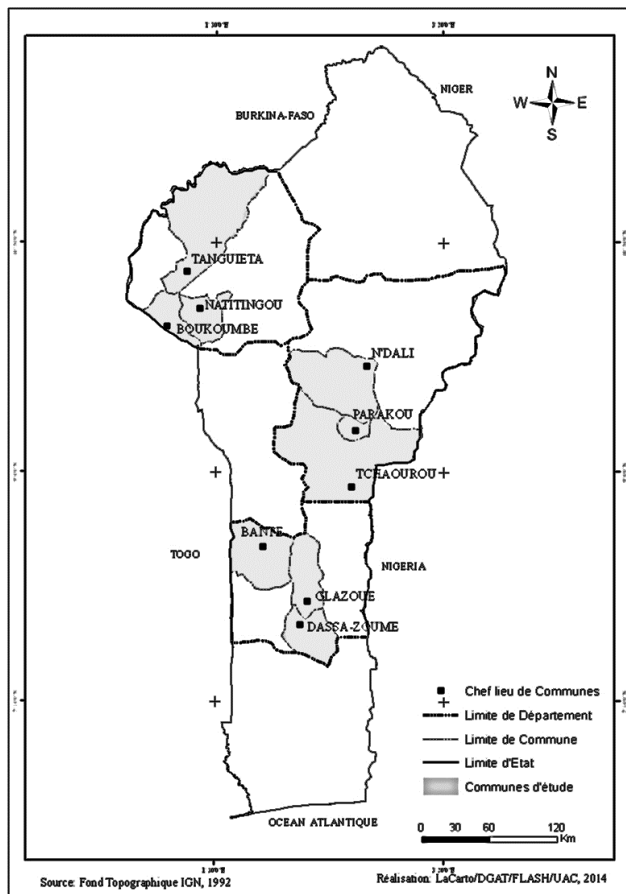


Figure 1. Localisation des villes d'étude sur la carte du Bénin

Tableau 1. Répartition des productrices enquêtées par ville d'étude (N = 45)

Départements	Villes	Effectifs des productrices
Atacora (n = 15)	Natitingou	5
	Boukoubé	5
	Tanguéta	5
Borgou (n = 15)	Parakou	5
	Tchaourou	5
	N'dali	5
Collines (n = 15)	Bantè	5
	Dassa	5
	Glazoué	5

Dénombrement et isolement des principaux microorganismes des ferments

Dénombrement des microorganismes

Les principaux groupes de microorganismes dénombrés sont les levures et moisissures, les bactéries lactiques et les entérobactéries. Ces espèces ont été dénombrées respectivement sur les milieux OGA, MRSA, M17 et VRBG avec les méthodes classiques de dénombrement décrites par Nout *et al.* (1989) et Hounhouigan *et al.* (1993).

Isolement des microorganismes

Après le dénombrement des microorganismes, des colonies représentatives ont été isolées puis ensemencées par stries serrées sur milieu PCA et incubés à 37°C pendant 24 heures. On a fait ensuite un repiquage en culture pure de toutes les colonies de types différentes obtenus sur milieu solide. Chaque souche a été repiquée dans du bouillon nutritif puis ensemencée par stries serrées sur gélose MRS et M17 pour les bactéries lactiques, sur la gélose OGA pour les levures et moisissure. Les souches pures sont obtenues après trois repiquages successifs.

Caractérisation physico-chimique

La teneur en eau ou en matières sèches (MS), la concentration en sucres exprimée en degré brix (°Brix), le pH et l'acidité titrable (AT) des échantillons collectés ont été déterminés. La teneur en matières sèches des échantillons a été déterminée par séchage à l'étuve à 105°C pendant 48 heures, suivi des pesées différentielles suivant la méthode AACC 44-15A (AACC, 1984).

Détermination du Taux de Matières Sèches (TMS)

Le TMS (**a**) des échantillons a été déterminée par séchage à l'étuve à 105°C pendant 48 heures suivi de pesées différentielles suivant la méthode AACC 44-15A (AACC, 1984).

Il a été calculé suivant la formule ci-après:

$$a (\%) = \frac{P_2 - P_0}{P_1} \times 100$$

Avec :

P₀ = Poids vide du creuset

P₁ = Poids de l'échantillon frais

P₂ = Poids de l'ensemble échantillon séché et creuset

pH et de l'acidité titrable

Le pH et l'acidité titrable ont été déterminés sur chaque échantillon de kpètè-kpètè suivant la méthode de Nout et *al.* (1989). Un pH-mètre portatif (Hanna HI 84 17) a servi à la lecture du pH dans une suspension aqueuse constituée de 10 g d'échantillon et de 20 mL d'eau distillée. Ensuite 70 ml d'eau distillée sont ajoutés au mélange. Après homogénéisation, on procède à la détermination de l'acidité titrable par titration avec du NaOH 0,1N jusqu'à la stabilisation du pH du mélange à 8,2. Les résultats sont exprimés en % d'acide lactique (base sèche). Il est retenu que 1 ml de NaOH à 0,1N neutralise 9 mg d'acide lactique. Le pourcentage d'acide lactique (b.s) a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'acide lactique (b.s)} = \frac{V}{M.a} \times 0,9$$

V = Volume de NaOH 0,1 N (en ml)

M = masse de l'échantillon (g)

a = Taux de Matières Sèches de l'échantillon.

Toutes les analyses sur chaque échantillon ont été répétées deux fois et les moyennes des valeurs obtenues ont été considérées.

Le degré Brix

La mesure de la concentration en sucre exprimée en degré Brix a été réalisée à l'aide d'un réfractomètre (Sopelem 9596, France), étalonné avec une solution tampon pH 7. On dépose une goutte d'échantillon humide sur la lentille du réfractomètre et la lecture est faite directement après exposition à la lumière.

Toutes les analyses sur chaque échantillon ont été répétées deux fois et les moyennes des valeurs obtenues ont été considérées.

Analyses statistiques des données

Les variances (ANOVA) ont été analysées avec le logiciel MINITAB 16 Afin de comparer les moyennes relatives aux variables chimiques et microbiologiques et leur corrélation. Le test LSD de regroupement de Fisher a été utilisé pour la structuration des moyennes. L'analyse en composante principale (ACP) de l'ensemble des variables a été faite avec le même logiciel pour structurer les variables en montrant le regroupement des communes, et

de les catégoriser. Les différences statistiques avec une valeur de probabilité inférieure à 0,05 ($P < 0,05$) ont été considérées comme significatives.

RÉSULTATS

Caractéristiques microbiologiques des ferments

L'analyse des variances a montré l'existence d'une différence significative entre les ferments provenant des différents départements ($p = 0,000 < 0,05$) en termes de charge en bactéries lactiques (Tableau 2). Cependant, aucune différence significative n'existe entre les ferments en matière de charge en levures et moisissures ($p = 0,159 > 0,05$), en entérobactéries ($p = 0,142 > 0,05$) ; Les bactéries lactiques et les levures et moisissures sont dominantes dans le ferment avec des valeurs tel que : (charges en Log UFC/g de bactéries lactiques= $7,73 \pm 1,58$; et charge en levure et moisissure= $6,9 \pm 1,52$. (Tableau 2).

Différents groupes de microorganismes isolés

Après le dénombrement des différents groupes de microorganismes, puis l'isolement des colonies représentant chaque groupes, 209 isolats de bactéries (composé des bactéries lactiques, des streptocoques, des levures et moisissure, des entérobactéries) ont été isolées.

Le Tableau 3 présente la répartition des isolats de chaque groupe de microorganismes. Le nombre d'isolats d'entérobactéries n'a pas été déterminé. Notons que les microorganismes isolés seront caractérisés (phénotypique et génotypique) dans la suite de nos travaux.

Tableau 2. Caractéristiques microbiologiques des ferments (dépôt de tchoukoutou) par département d'étude (données en log UFC/g)

Départements	Bactéries lactiques	Levures et moisissures	Entérobactéries	Streptocoques
Atacora (n=15)	$7,73 \pm 1,58^a$	$6,9 \pm 1,52^a$	$5,15 \pm 2,65^a$	$4,49 \pm 3,45^a$
Borgou (n=15)	$6,27 \pm 2,45^b$	$6,07 \pm 2,23^a$	$4,3 \pm 2,45^a$	$2,846 \pm 3,53^a$
Collines (n=15)	$5,27 \pm 1,57^b$	$5,64 \pm 1,52^a$	$3,3 \pm 2,42^a$	$4,47 \pm 1,59^a$

*Les moyennes en colonne ne partageant aucune lettre sont significativement différentes au seuil de 5 % selon le test de regroupement de Fisher.

Tableau 3. Répartition des isolats des différents groupes de microorganismes

Groupe de microorganismes	Nombre d'isolats
Bactéries lactiques	148
Streptocoques	69
Levures et moisissures	70
Entérobactéries	ND

ND : Non déterminé

Caractéristiques physicochimiques des ferments

Il existe une différence significative entre le pH moyen ($3,59 \pm 0,38 - 4,461 \pm 0,67$) des ferments humides dans les trois départements d'étude, tandis que l'analyse de la variance, sur l'acidité titrable des ferments ($0,11 \pm 0,03 - 0,16 \pm 0,08$) indique une égalité des moyennes au seuil de 5 % (Tableau 3). Cependant, globalement les ferments sont caractérisés par une très faible acidité titrable. Le dépôt humide de *tchoukoutou* « *kpètè-kpètè* » a un taux de matière sèche de $7,4 \pm 2,63$ et un taux de °Brix (concentration en sucres) de $6,46 \pm 2,46$ (Tableau 4). Il n'y a aucune différence significative entre les ferments des trois départements en ce qui concerne le taux de matière sèche. La détermination du taux de sucre (degré brix), permet de distinguer deux groupes de ferment au niveau des départements : il s'agit des ferments de l'Atacora et du Borgou qui sont identiques et qui sont significativement différents aux ferments des Collines au seuil de 5 %.

Tableau 4. Caractéristiques physico-chimiques des ferments par départements d'étude

Départements	Matièresèche (%)	pH	AciditéTitrable	°Brix
Atacora (n =15)	7,468 ± 2,96 ^a	4,461 ± 0,67 ^a	0,11 ± 0,03 ^a	4,42 ± 1,73 ^a
Borgou (n = 15)	6,69 ± 2,30 ^a	4,04 ± 0,34 ^b	0,14 ± 0,05 ^a	4,25 ± 1,90 ^a
Collines (n =15)	7,76 ± 2,65 ^a	3,59 ± 0,38 ^c	0,16 ± 0,08 ^a	6,46 ± 2,46 ^b

*Les valeurs de la même colonne ayant des lettres différentes présentent une différence significative au seuil de 5%. Acidité Titrable en % d'acide lactique b.s

Corrélation entre les différentes variables étudiées

Le Tableau 5 présente les résultats du test de corrélation de Pearson entre les différentes variables étudiées (le Taux de Matière Sèches, le pH, l'Acidité Titrable, les concentrations en sucre des ferment exprimées en Degré Brix ; les charges en Bactéries Lactiques en levures et Moisissures, en Entérobactéries et en Streptocoques).

L'analyse des résultats montrent que l'augmentation de l'acidité titrable est significativement corrélée à la diminution du pH (Figure 2).

Tableau 5. Matrice de corrélation de Pearson entre les différentes variables

Variabes	MS	pH	AT	°Brix	BL	L&M	Entéro	Strepto
MS	1,00							
pH	-0,119	1,00						
AT	-0,146	-0,665***	1,00					
°Brix	0,715***	-0,269	-0,103	1,00				
BL	-0,022	0,779***	-0,547***	0,148	1,00			
L&M	0,096	0,352*	-0,248	0,035	0,464***	1,00		
Entéro.	-0,126	0,562***	-0,539***	0,101	0,665***	0,581***	1,00	
Strepto.	0,428**	0,007	0,029	0,275	0,130	0,045	-0,031	1,00

MS : Matière Sèche ; AT : Acidité titrable ; BL : Bactéries Lactiques ; L&M : Levures et Moisissures ; Entéro : Entérobactéries ; Strepto : Streptocoques.

* : Significatif au seuil de 5 % ; ** Significatif au seuil de 1% ; *** : très hautement significatif au seuil de 1%.

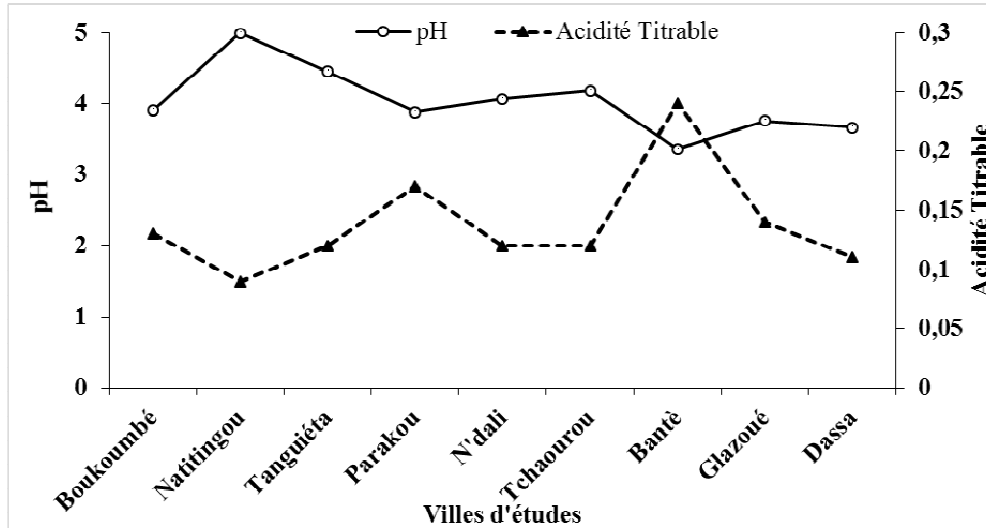


Figure 2. Courbe de Corrélation du pH et l'A.T (Coefficient de corrélation de Pearson = 0,464)

On observe une baisse progressive du pH ($4,461 \pm 0,67$ à $3,59 \pm 0,38$) des ferments des communes de Boukoubé, Natitingou, Tanguiéta et Parakou vers les communes de N'dali, Tchaourou, Bantè, Glazoué et Dassa (Figure 1). Le pH ($4,03 \pm 0,58$) fortement corrélé à l'acidité titrable (Coefficient de corrélation = 0,665) devrait donc garantir une certaine sécurité hygiénique des ferments. Mais nous observons la présence des Entérobactéries, corrélée positivement aux charges en bactéries lactiques et levures/moisissures des ferments.

La Figure 3 présente la courbe de corrélation des Bactéries Lactiques et Levures-Moisissures (Coefficient de corrélation de Pearson = 0,464). L'analyse de la courbe montre que, l'évolution des bactéries lactiques s'accompagne du développement des levures et moisissures (Coefficient de corrélation = 0,464^{***}) quel que soit la provenance des ferments.

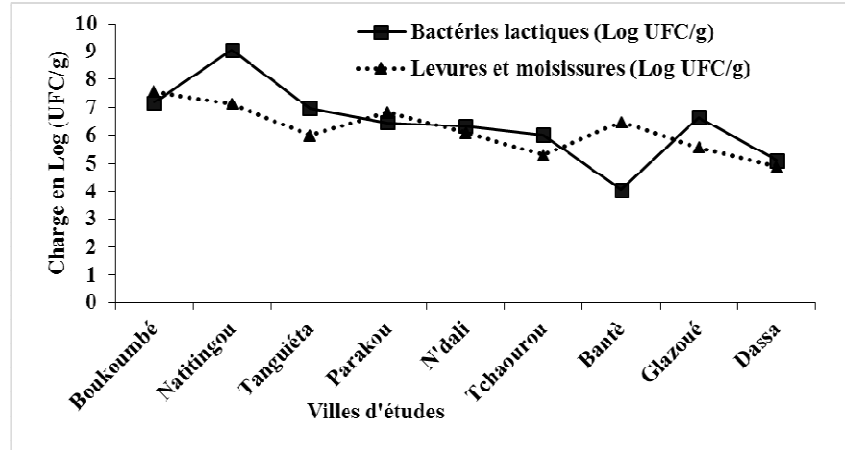


Figure 3. Courbe de corrélation des Bactéries Lactiques et Levures-Moisissures (Coefficient de corrélation de Pearson = 0,464)

Analyse en Composante Principale (ACP)

Valeurs propre et proportion d'information sur les axes

Le Tableau 6 présente les valeurs propres et les proportions d'informations concentrées sur les axes. Trois composantes principales permettent d'expliquer 86,8 % de la variation totale. L'axe 1 permet d'expliquer 49,2 % des informations, l'axe 2 explique 23,4 % des informations et l'axe3 explique 14,2 % des informations de départ. On peut donc considérer les trois axes pour l'interprétation des résultats.

Tableau 6. Valeurs propres et proportion d'informations concentrées sur les axes

Informations sur les axes	Valeur propre	Proportion	Cumulée
Axe1	3,9379	0,492	0,492
Axe 2	1,8701	0,234	0,726
Axe 3	1,1387	0,142	0,868
Axe 4	0,58	0,073	0,941
Axe 5	0,3888	0,049	0,989
Axe 6	0,0633	0,008	0,997
Axe 7	0,0162	0,002	0,999
Axe 8	0,0049	0,001	1

Corrélation entre les composantes principales et les variables initiales

Le Tableau 7 présente les corrélations entre les composantes principales et les variables initiales. L'analyse des résultats montrent que les paramètres, pH, la charge en entérobactéries et en bactéries lactiques (BL) sont corrélés positivement au premier axe (PC1). Le taux de matière sèche (MS) et la concentration en sucre exprimée en °Brix sont corrélés négativement au deuxième axe (PC2) tandis que l'acidité titrable est corrélée positivement au même axe. Les charges en levures et moisissures et en streptocoques sont corrélées positivement au troisième axe (PC3). Tous ces paramètres permettent de classer les ferments.

Tableau 7. Corrélation entre les composantes principales et les variables initiales

Variables	PC1	PC2	PC3	
MS		-0,311	-0,396	-0,324
pH		0,414	-0,285	-0,059
AT		-0,252	0,615	-0,093
°Brix		-0,354	-0,409	-0,059
BL		0,440	-0,265	-0,238
LM		0,320	0,383	-0,447
Entéro		0,448	0,002	-0,090
Strepto		-0,215	0,005	-0,784

Regroupement des ferments en fonction des similarités

La Figure 4 présente le regroupement des ferments des différentes villes en fonction de leurs similarités par rapport aux caractéristiques physicochimiques et microbiologiques. L'analyse de la figure montre que les ferments des 9 villes sont regroupés en deux grands groupes. Le premier groupe G1 est subdivisé en deux sous-groupes (G1A et G1B). Le sous-groupe G1A est constitué des ferments provenant des villes de Boukoumbé, N'dali, Parakou, Tchaourou. Le deuxième sous-groupe (G1B) est constitué des ferments des villes de Tanguiéta, Bantè, Glazoué, Dassa. Le deuxième groupe (G2) comporte uniquement les ferments de Natitingou. On observe une hétérogénéité au niveau des deux sous-groupes. Seul le dernier groupe est homogène.

Le Tableau 8 présente la description des groupes à partir des paramètres physicochimiques et microbiologiques. L'analyse des résultats montre qu'il existe une différence hautement significative entre la variable matière sèche (MS), très significative entre les charges en bactéries lactiques (BL) et entérobactéries puis significatif entre la variable °Brix. Il n'y a pas de différence significative entre les variables pH, Acidité titrable et les charges en levures et moisissures.

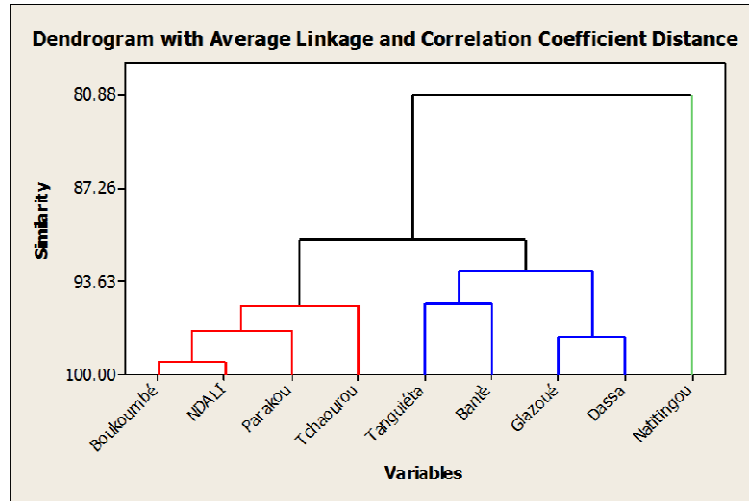


Figure 4. Regroupement des ferments des différentes communes en fonction de leur similarité

Tableau 8. Description des groupes à partir des paramètres physicochimiques et microbiologiques

Paramètres	Groupes			
	G1A	G1B	G2	F
MS	7,0675 ^b	8,1825 ^a	4,75 ^c	3,539 ^{***}
pH	4,0075 ^a	3,8075 ^a	4,99 ^a	1,219
AT	0,135 ^a	0,1525 ^a	0,09 ^a	0,064
°Brix	4,485 ^a	6,125 ^a	2,94 ^b	3,284 [*]
BL	6,491 ^b	5,725 ^c	9,06 ^a	3,472 ^{**}
LM	6,45 ^a	5,725 ^a	7,13 ^a	1,449
Entéro	4,645 ^b	3,515 ^b	6,79 ^a	3,565 ^{**}
Strepto	3,16 ^a	4,6725 ^a	3,44 ^a	1,233

Les mêmes lettres dans une même ligne signifient qu'il n'y a pas de différence significative entre les valeurs et différentes lettres signifient qu'il y a de différence significative entre ces valeurs.

* : Significatif au seuil de 5% ; ** Significatif au seuil de 1% ; *** : très hautement significatif au seuil de 1‰.

F : valeur de fisher.

Le groupe G1 est constitué de deux sous-groupes. Ces deux sous-groupes sont différenciés par les paramètres matières sèches et charge en Bactéries lactique. Le groupe G1A est caractérisé par des ferments ayant un taux moyen de matière sèche (7,065) et une charge moyenne en bactéries lactiques(6,491). Le groupe G1B est caractérisé par un taux élevé de matière sèche (8,182) et une charge faible en bactéries lactiques (5,725).

Le groupe G2 est caractérisé par les ferments ayant un taux faible en matière sèche (4,75) et une charge très élevée en bactéries lactiques (9,06) et en entérobactéries (6,79). Les ferments de ce groupe ont une concentration en sucre exprimée en °Brix très faible (2,94).

DISCUSSION

Ce travail est basé sur la caractérisation microbiologiques et physicochimique du dépôt humide « *kpètè-kpètè* » des bières traditionnelles produites au Bénin. Une grande variabilité existe entre les échantillons de ferment de *tchoukoutou/tchakplo* (coefficients de variation généralement très élevées). L'exception est celui du pH qui est relativement faible (14% environ). Ceci peut s'expliquer par deux facteurs : la variation de la durée des opérations unitaires de transformation au niveau des productrices, le choix des variétés de la matière première, les imperfections technologiques et les traitements faits par les productrices sur le ferment humide influençant ainsi leur caractéristique microbiologique et physicochimique. . En effet, les pratiques varient d'une productrice à une autre et au niveau d'une même productrice, d'une production à l'autre Kayodé *et al.* (2005), l'ont constaté chez trois productrices de malts pour la fabrication de *tchoukoutou* au Bénin. Ces résultats confirment également les études de plusieurs auteurs (Greppi *et al.*, 2013 ; Sefa Dedeh *et al.*, 1999 ; Dmuyakor & Ohta, 1991 ; Odunfa *et al.*, 1985,) à travers leurs études réalisées sur les caractéristiques des bières traditionnelles qui ont rapporté que les fréquences de distribution des espèces microbiennes isolées des bières africaines varient suivant les localités et les ingrédients utilisés pour le brassage.

Les charges (en Log UFC/g de ferment) en bactéries lactiques ($7,73 \pm 1,58$) ; levures et moisissures ($6,9 \pm 1,52$) sont dominantes dans le ferment « *kpètè-kpètè* ». Les bactéries lactiques et les levures et moisissures sont donc responsables de la fermentation de *tchoukoutou* (Kayodé *et al.*, 2006). De même, des études ont montré que les bactéries lactiques et les levures sont des microorganismes généralement dominants dans la plupart des produits fermentés à base de céréales et de manioc en Afrique de l'Ouest (Ekundayo

1969 ; Hounhouigan *et al.*, 1993 ; Lei *et al.*, 1999 ; Oyewole, 2000). Cependant, ces deux microorganismes semblent être faiblement présents dans le ferment que dans la bière *tchoukoutou* (BL : 7,6 à 7,9 log₁₀ ufc, LM : 7.8 à 8,5 log₁₀ ufc selon Kayodé *et al.* (2007). La présence dans le ferment d'autres microorganismes justifie cette faible viabilité des bactéries lactiques et des levures. Par ailleurs, l'évolution des bactéries lactiques semble s'accompagner du développement des levures. Ceci est le résultat d'une association symbiotique entre les levures et les bactéries lactiques. En effet, les bactéries lactiques créent un environnement acide favorable à la prolifération des levures qui produisent à leur tour des vitamines et d'autres composés de croissance pour les bactéries (Steinkraus, 1996). Ces résultats sont conformes à ceux de Maoura *et al.* (2006) qui ont constaté que les concentrations de la flore lactique et levurienne sont pratiquement identiques dans le « *bili-bili* », bière traditionnelle tchadienne

Les valeurs élevées des concentrations en sucre (exprimée en degré Brix) observées dans les certaines villes sont dues à la faible charge en levures et au ralentissement de l'activité bactérienne dans les ferments (condition de pH défavorable). En effet, les sucres sont les nutriments indispensables pour la fermentation alcoolique en brasserie et constituent la source principale d'énergie pour le métabolisme des levures

La faible acidité titrable (pH élevé) observée, de certains ferments serait due à la présence de divers microorganismes qui inhibent l'activité acidophile des bactéries lactiques du ferment.. Cette variation des caractéristiques physico-chimiques du ferment n'est pas observée sur le *chakpalo* en Côte-d'Ivoire. En effet, Aka *et al.* (2008) ont constaté au cours de leur étude portant sur la variabilité des propriétés physico-chimiques et microbiologiques du *chakpalo*, que le pH des moûts sucrés étaient statistiquement les mêmes chez toutes les brasseuses et ne variaient pas d'une production à une autre. Cependant nos résultats révèlent que le ferment «*kpètè-kpètè*» est un produit moins acide que la bière (pH = 3,2 et acidité titrable de 0,5 à 0,8) dont elle est provient. Cette diminution de l'acidité est une conséquence de la dilution du substrat de fermentation, de l'utilisation de l'acide lactique par les levures ou du ralentissement de l'activité bactérienne. Ce résultat corrobore ceux d'autres études, qui ont rapporté qu'une baisse progressive du pH s'accompagne d'une augmentation de l'acidité titrable au cours des fermentations naturelles (Michodjéhoun *et al.*, 2005 ; Dziedzoaze *et al.*, 1996 ; Sulma *et al.*, 1991). Une autre étude, ajoute que c'est une caractéristique de la fermentation des céréales (Efiuvwevwere & Akona ,1995).

Les études réalisées sur la bière traditionnelle *tchoukoutou* par Kayodé *et al.* (2007), montrent qu'il y a une réduction de la matière sèche dans les ferments par rapport à la bière. En effet le taux de la matière sèche dans le *tchoukoutou* varie de 4,8 à 13,5 quel que soit le procédé utilisé. Cette diminution confirme qu'il y a une utilisation de la matière puis une production d'eau par les bactéries lactiques et les levures au cours des réactions métaboliques. Ce résultat corrobore celui de Hounhouigan *et al.*, (1993) au cours de leur étude réalisée sur la composition physicochimique et microbiologique du *mawè* au Bénin. Ces faibles valeurs de matière sèche sont dues à l'action combinée des bactéries lactiques et des levures ainsi que d'autres microorganismes tels que les Entérobactéries dont le milieu favorise leur croissance. Les ferments sont des produits acides. Plusieurs auteurs (Nout *et al.*, 1989 ; Mensah *et al.*, 1990) affirment que l'acidité des produits fermentés inhibe le développement de la flore indésirable telle que les entérobactéries. Mais certaines espèces d'entérobactéries, supportant une acidité élevée et sont responsables des intoxications alimentaires.

En plus l'analyse en composante principale (ACP) nous permet de classer les ferments et de les regrouper en fonction de leur similarité. Cette analyse nous a permis de classer en deux grands groupes les ferments. Ces résultats confirment ceux des travaux d'Amane *et al.* (2005) qui ont effectué une étude sur la caractérisation physicochimique du *tchakpalo* en Côte d'Ivoire dans plusieurs zones de Yamoussoukro. Ces auteurs ont montrés qu'il y avait une variabilité entre les productions au sein d'une même brasserie et d'une brasserie à une autre. La différence significative observée entre ces deux groupes peut s'expliquer par le fait que les paramètres mesurés varient d'une zone de production à une autre. Ce qui signifie que la qualité du ferment « *kpètè-kpètè* » ne pas être généralisée. Il est donc indispensable de définir les paramètres qui permettent de fabriquer des bières et par conséquent des ferments de qualité constante dans le temps et dans l'espace.

CONCLUSION

Les analyses physico-chimiques et microbiologiques ont permis de comparer les dépôts humides des bières locales *tchoukoutou* selon leur provenance. Les charges en bactéries lactiques, levures et moisissures sont dominantes par rapport aux autres bactéries dans le « *kpètè-kpètè* » ferment du *tchoukoutou/tchakpalo*. Les entérobactéries sont présentes dans les ferments corrélés positivement aux charges en bactéries lactiques et levures/moisissures. Il y a également une diminution remarquable dans le ferment des caractéristiques utiles reconnues à la bière elle-même. La

caractérisation simultanée du *tchoukoutou/tchakpalo* et du ferment « *kpètè kpètè* ou » peut confirmer la diminution des caractéristiques reconnues à la bière.

Les bactéries lactiques et levures contenues dans le ferment doivent être, identifiées et caractérisées afin de connaître les différentes espèces de bactéries lactiques, de levures/moisissures et d'Entérobactéries contenus dans les ferments. Il serait donc intéressant d'étudier les propriétés probiotiques de ces bactéries lactiques. Les espèces identifiées pourront être utilisées comme starter pour une fermentation contrôlée des bières traditionnelles du Bénin.

REMERCIEMENTS

Nous remercions très sincèrement le Programme de Fonds Compétitifs pour la Recherche (PFCR/ UAC/ 2012) de l'université d'Abomey-Calavi pour son soutien financier pour la réalisation de ce travail. Nous remercions également le professeur Guy Apollinaire MENSAH et le Docteur Alice Koubourath IGUE DJINADOU pour l'apport considérable reçu à travers leur formation concernant les outils indispensables pour une bonne rédaction d'un article scientifique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- AACC. 1984. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists 1984, 8th ed St Paul, Minnesota, USA.
- AKA S., DJENI N'DÉDÉ T., N'GUESSAN K. F., YAO K.C & DJE K. M. 2008. Variabilité des propriétés physico-chimiques et dénombrement de la flore fermentaire du tchapalo, une bière traditionnelle de sorgho en Côte d'Ivoire. *Afrique SCIENCE* 04(2) : 274-286.
- AMANE.N.D., ASSIDJO N.E., GBONGUE M.A., BOHOSSOU K., CARDOT P. 2005. *Agronomie Africaine*, 17(2) 143-152.
- BLANDINO A., AL-ASEERI M. E., PANDIELLA S. S., CANTERO D. & Webb C. 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* 36, 527-543.
- DZIEDZOAZE T. N., Ellis W. O & OL DHAM J. H. 1996. Effect of cassava varietal differences and fermentation time on the quality of agbelina. In: Halm, M., Jakobsen, M. (Eds), traditional fermented food processing in Africa, proceeding of the Third Biennial Seminar on African fermented food, FRI, DANIDA, KVL, July. Accra, Ghana, pp. 17 – 25.
- EFIUVWEVWERE B. J. O & AKONA O. 1995. The microbiology of kununzaki, 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. *International Journal of Food Science & Technology*, 4 : 217-225.
- FAO/STAT. 2012. Base de données FAO, consultée en ligne sur le site www.faostat.org le 13/12/2012

- GREPPI A., RANTSIOU K., PADONOU W., HOUNHOUGAN J., JESPERSEN L., JAKOBSEN M. & COCOLIN L. 2013. Determination of yeast diversity in ogi, mawè, gowé and tchoukoutou by using culture-dependent and -independent methods. *Int. J. Of food microbiology*. 165(2) : 84-88.
- GRAJEK W., OLEJNIK A., & SIP A. 2005. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *ACTA Biochimica. Polonica* 52 (3) : 665-671.
- HOUNHOUGAN D. J., NOUT M. J. R., NAGO C. M., HOUBEN J. H. & ROMBOUTS F. M., 1993. Composition microbiological and physical attributes of mawè, a fermented maize dough from Benin. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 28 : 513-517.
- HOUNHOUGAN, D. J., NOUT, M. J. R., NAGO, C. M. HOUBEN, J. H., HOUBEN J. H. & ROMBOUTS, F.M. 1993. Changes in the physico-chemical properties of maize during natural fermentation of mawè. *J. Cereal Sci.* 17 : 291-300.
- HOUNHOUGAN M. H. 2007. Evaluation et amélioration de la technologie traditionnelle de production de « kpètè-kpètè », un ferment utilisé pour la fermentation de tchoukoutou. Thèse Ingénieur Agronome, FSA/UAC.
- KAYODE A. P. P., DEH D.C, BABA-MOUSSA L. S., KOTCHONI S. O. & HOUNHOUGAN J. D. 2012. Stabilization and preservation of probiotic properties of the traditional starter of African opaque sorghum beers, in *African Journal of Biotechnology*, 11(30) : 7725-7730
- KAYODÉ A. P. P., HOUNHOUGAN D. J., NOUT M. J. R., & NIEHOF A., 2007. Household production of sorghum beer in Benin : technological and socio-economic aspects, in *International Journal of Consumer Studies*, 31 : 258-264.
- KAYODÉ A. P. P., LINNEMANN A. R., NOUT M. J. R., HOUNHOUGAN J. D., STOMPH T. J., & SMULDERS M. J. M. 2006. Diversity and food quality properties of farmers' varieties of sorghum from Benin. *J Sci Food Agric*, 86 : 1032-1039.
- KAYODÉ A. P. P., ADÉ GBIDI A., LINNEMENT A. R., NOUT M. J. R. & HOUNHOUGAN D. J. 2005. Quality of farmer's varieties of sorghum and derived foods as perceived by consumers in Benin. *Ecology of food and Nutrition*, 44, 271-294.
- KÜHLE A.V., JESPERSEN L., GLOVER R. L, DIAWARA B., & JAKOBSEN M. 2001. *Yeast*. 18 : 1069-1079
- MAOURA N., MBAIGUINAM M., GAILLARDIN C., & POURQUIE J., 2006. Suivi technique, analytique et microbiologique de la bili-bili, bière traditionnelle Tchadienne, *Afr. Sci.* 02 : 69-82.
- MERCENIER A. 1999. Lactic acid bacteria as vaccines. In: Tannock, G. (Ed.), *Probiotics: A Critical Review*, Horizon Scientific Press, and Norfolk, UK. 113-128.
- MISSIHOUN A. A., ADOUKONOU-SAGBADJA H., DAGBA R. A., AHANHANZO C. & AGBANGLA C. 2012. Impacts des pratiques culturelles sur l'organisation génétique des sorghos. *Journal of Applied Biosciences*, 60 : 4394- 4409.
- MICHODJÈHOUN-MESTRES L., HOUNHOUGAN D. J., DOSSOU J. & MESTRES C. 2005. Physical, chemical and microbiological changes during natural fermentation of Gowe, a sprouted or non-sprouted sorghum beverage from West-Africa. *Afr J Biotechnol* 4, 487-496.
- MUGULA J. K., NARVHUS 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 (3) : 307-318.
- NOUT M. J. R. 2009. Rich nutrition from the poorest – Cereal fermentations in Africa and Asia. *In Food Microbiology*, 26 : 685-692.

- NOUT M. J. R., HOUNHOUGAN D. J. & BOEKEL V. T. 2003. Les aliments: Transformation, conservation et qualité CTA. Backhuys publisher's p 263
- NOUT M. J. R. & SARKAR P. K. 1999. Lactic acid food fermentation in tropical climates. Antoine Van Leeuwenhoek 76 : 395-401.
- NOUT M. J. R. & 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. 1994. Fermented foods and food safety. Food research International 27: 291
- NOUT M. J. R., ROMBOUITS F. M. & HAVELAAR A. 1989. Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic micro-organisms. International Journal of Food Microbiology, 8 : 351-361.
- NOUT M. J. R. 1987. Composition of foods: African traditional beers. Laboratory new letter, 8 : 18.
- NOUT M. J. R. 1992. Upgrading traditional biotechnological processes. In: Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods. A Report on an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development National Academy Press, Washington, D. C., pp. 11-19.
- ODUNFA S. A. & ADEYELE S. 1985. Microbial changes during traditional production of ogi -baba, a western Africa fermented sorghum gruel. J. cereal Sci., 3 : 173 - 180.
- ODUNFA S. A. 1985. African fermented foods. In B. J.B. Wood (Ed.), Microbiology of fermented foods. London, UK. 167-195.
- SANNI A. I. & LONNER C. 1993. Identification of yeast isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. Food Microbiol., 10 : 517-523.
- SANNI A. I., ONILUDE A. A., FADAHUNSI I. F. & AFOLABI R. O. 1999. Microbial deterioration of traditional alcoholic beverages in Nigeria. In Food Research International, 32 (3): 163-167
- SEFA-DEDEH S., SANNI A. I., TETTEH G. & SAKYI-DWSON E. 1999. Yeasts in the traditional brewing of pito in Ghana. World journal of microbiology and Biotechnology, 15 : 593-597.
- STEINKRAUS K. H. 1996. Handbook of Indigenous Fermented Foods, 2nd ed, Marcel Dekker, New York.
- SULMA I., LARRY R. S. & KIRLEIS A. 1991. Isolation and characterization of microorganisms associated with the traditional sorghum fermentation for production of Sudanese Kira. J. Appl. Environ. Microbiol, 57 : 2529 – 2533.
- VAN DER A. A., KÜHLE A., JESPEREN L., GLOVER R. L. K., DIAWARA B. & JAKOBSEN M., 2001. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer. Yeats, 18 : 1069-1079.