

Année Universitaire
2012-2013

Numéro d'ordre
167

Soutenue publiquement
le 02-12-2013

THESE

Présentée pour l'obtention du Doctorat unique en Sciences et
Technologies des Aliments

Spécialité : Biotechnologie et Microbiologie des Aliments

Par :

KARAMOKO Detto

THEME

**Caractéristiques biochimiques,
microbiologiques et dynamique des
bactéries lactiques au cours de la
production et du stockage du vin de
palme de deux variétés de palmiers :
*Dura et Tenera***

Commission d'examen :

Président

- M. KOUAME Patrice, Professeur titulaire, UNA

Directeur

- M. DJE Koffi Marcellin, Professeur titulaire, UNA,

Rapporteur

- Mme. HAUHOUOT-A. Marie Laure, Professeur titulaire, UFHB

Examineurs

- Mme. FAYE-KETTE Hortense, Professeur titulaire, UFHB

- Mme. KOUSSEMON Marina, Maître de conférences, UNA

- M. YAPI Houphouët Félix, Maître de conférences, UFHB

DEDICACES

A L'ETERNEL DES ARMEES

DIEU, je ne suis rien, je n'ai rien, je ne vaud rien et je ne sais rien ; qu'au nom de ton fils JESUS, ton grand amour renouvelle ma vie.

A ma famille paternelle KARAMOKO

Pour tout votre amour, votre soutien sans faille, vos sacrifices et vos prières. Les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments et la reconnaissance que je vous dois. Sachez tout simplement que sans vous, je n'existe pas.

A ma famille maternelle SIAGBE, Vos prières, vos soutiens et vos encouragements n'ont pas été vains. Recevez par cette thèse toute mon affection et ma reconnaissance.

A ma mère DOUALE Sialou

A mes frères et sœurs

A mes neveux et nièces

A ma fiancée KONE Koudiala

A mon fils aîné KARAMOKO Moulou Juste Rodrigue

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'aurait vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité de mon directeur de recherche, Monsieur DJE Koffi Marcellin, Professeur titulaire à l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologies des Aliments (UFR-STA) qui m'a offert l'opportunité de réaliser ce projet au sein de son équipe. Je voudrais le remercier pour le temps ainsi que son optimisme affiché malgré toutes les contraintes. De plus, les conseils, qu'il m'a donnés tout au long de la rédaction, ont toujours été clairs et succincts, me facilitant grandement la tâche et me permettant d'aboutir à la production de cette thèse.

Mes remerciements vont à l'endroit de Monsieur KOUAME Patrice Lucien, Professeur titulaire d'enzymologie, Doyen de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologies des Aliments (UFR-STA) pour son appui à la recherche. Je suis particulièrement sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance malgré son calendrier administratif et universitaire très chargé.

Je tiens à remercier également Monsieur TANO Yao, Professeur titulaire, Président de l'Université Nangui Abrogoua pour cette grande institution dont il a la lourde charge de diriger avec rigueur et pour son appui à la recherche.

Je remercie le Professeur NANGA Zinzerdorf Yessé, Maître de conférences agrégé à l'Université Félix Houphouet Boigny qui m'a fait l'honneur de juger cette thèse en qualité de rapporteur et membre du jury.

Je remercie le Professeur HAUHOUOT-ATTOUNGBRE Marie Laure, Professeur titulaire à l'Université Félix Houphouet Boigny pour la célérité avec laquelle elle a analysé cette thèse. C'est aussi un plaisir de la retrouver comme membre du jury.

Mes vifs remerciements vont à l'endroit du Professeur FAYE-KETTE Hortense, Professeur titulaire à l'Université Félix Houphouet Boigny ; du Professeur KOUSSEMON Marina, Maître de conférences à l'Université Nangui Abrogoua ; du Professeur YAPI Houphouet Félix, Maître de conférences agrégé à l'Université Félix Houphouet Boigny, pour avoir accepté de participer à ce jury de soutenance.

J'aimerais par ailleurs souligner la contribution importante réalisée par les docteurs DJENI N'dédé Théodore et N'GUESSAN Kouadio Florent, tous enseignants chercheurs de microbiologie à l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologies des

Aliments (UFR-STA). Leur expertise au niveau de la microbiologie des aliments a été d'un précieux recours pour l'interprétation des résultats des différentes analyses microbiologiques. Leurs commentaires, leurs suggestions et leurs conseils ont été fort judicieux et appréciés.

Je voudrais également remercier tous les enseignants de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologies des Aliments (UFR-STA) qui n'ont ménagé aucun effort pour nous aider lorsque nous étions dans le besoin. Je pense particulièrement aux professeurs AMANI Georges, KOUSSEMON Marina et Koffi Rose NEVRY, aux Docteurs, Aka Solange GBEZO, TOKA Marie, KACOU Celah, AGBO Adouko Edith.

Mes plus chaleureux remerciements vont à l'endroit de tous mes amis, mes camarades et compagnons de recherche avec lesquels nous avons travaillé dans la fraternité et la convivialité et dont l'aide a été précieuse aussi bien pour leurs critiques constructives que par les encouragements. Il s'agit entre autres de BOUATENIN Koffi Maïzan Jean-Paul, KOUAME Kohi Alfred et YORO Dezay Thierry.

Je n'oublie évidemment pas de remercier mon ami personnel Monsieur SEHI B. Ernest, Ingénieur à SOLIBRA Treichville, pour ses encouragements, son soutien moral et financier apportés lors de la rédaction de cette thèse. Les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments et la reconnaissance que je lui dois mais que DIEU lui donne la grâce.

Je salue le volontariat de Monsieur N'DRI Kanga Moïse et de Monsieur KOUASSI Akalé Paulin, qui ont accepté de participer activement à la partie expérimentale pendant l'extraction du vin de palme de cette thèse.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance envers mes parents, singulièrement à KARAMOKO Yokolé Nicolas, KARAMOKO Tiémoko, Soba KARAMOKO, Docteur KARAMOKO Pierre François, KARAMOKO Sounkolé Joseph, KARAMOKO Zata Fabien, KARAMOKO Madeleine et KARAMOKO Lèmè Honoré pour leurs efforts consentis tant au plan financier qu'au plan moral afin de produire cette thèse.

Je souhaite également adresser mes salutations et mes remerciements à toute la famille SIAGOUE qui m'a offert un cadre et un environnement propice pour mes études. Merci à vous SIAGOUE Aubin, SIAGOUE Simon et SIAGOUE Narcisse et tous ceux qui nous ont devancé d'un pas.

Une partie de ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide précieuse de Monsieur BONOUMAN Joël. Je souhaite lui témoigner ma reconnaissance pour sa gentillesse et ses compétences techniques lors des analyses par les méthodes HPLC et CPG.

Je voudrais également souligner la participation et le soutien de KONE Koudiala ma fiancée, et enfin remercier chaleureusement tous mes camarades et amis notamment BROU Koffi Siméon, COULIBALY Wahauwoulé Hermann et KOUASSI Kra Athanase qui ont participé à la discussion entourant les travaux de cette thèse et pour le soutien moral qu'ils m'ont apporté tout au long de la réalisation de ces travaux.

RESUME

Le vin de la palme est la sève fermentée de plantes monocotylédones rencontrées dans la zone intertropicale. Malgré le rôle considérable que joue cette boisson dans l'activité économique des pays producteurs et consommateurs, de nombreux problèmes liés aux différents aspects des processus de fermentation des aliments traditionnels ont été relevés. Il s'agit entre autres du manque des bonnes pratiques de fabrication ou d'hygiène, la non maîtrise du processus de fabrication, l'absence de contrôle de certains paramètres (le pH, la température et la qualité de l'eau), le manque de connaissance de l'implication nutritionnelle et toxicologique de la fermentation. Cette étude vise à rechercher les caractéristiques biochimiques, microbiologiques et suivre la dynamique des bactéries lactiques au cours de la production et du stockage du vin de palme de deux variétés de palmiers. Des prélèvements de vin de palme ont été réalisés tous les trois jours pendant l'exploitation des palmiers à huile des variétés *Tenera* et *Dura*. Différentes analyses microbiologiques et physico-chimiques ont été réalisées sur les vins pendant quatre (4) semaines d'exploitations.

Le vin de palme de la variété *Dura* est riche en sucres totaux ($501,68 \pm 26$ g/L), sucres réducteurs ($45,6 \pm 6,4$ g/L), une viscosité élevée (8,28 cP), un faible taux d'éthanol ($0,08 \pm 0,02$ %), et un pH moins acide ($5,23 \pm 0,03$) que celui du vin de la variété *Tenera*. Pendant l'exploitation du vin de palme, tous les paramètres cités diminuent progressivement jusqu'à la fin de l'exploitation. La vitamine C et le taux d'éthanol restent élevés dans le vin de la variété *Tenera*. La charge des microorganismes est plus élevée dans les vins extraits de la variété *Tenera*. En début d'exploitation, les charges sont de $\log 10,2 \pm 0,1$ UFC/mL pour les GAM. Les charges des bactéries lactiques, les levures, les Entérocoques, les coliformes totaux et les germes anaérobies sulfite-réducteurs sont respectivement de $\log 8,6 \pm 0,2$ UFC/mL, $\log 5,6 \pm 0,3$ UFC/mL, $\log 7,5 \pm 0,2$ UFC/mL, $\log 7,5 \pm 0,2$ UFC/mL et $\log 1,6 \pm 0,2$ UFC/mL. Ces charges restent élevées jusqu'à la fin de l'exploitation des palmiers.

Des prélèvements de vin de palme ont aussi été réalisés le premier jour et toutes les semaines au cours de l'exploitation des palmiers à huile de la variété *Dura*. Dans les différents vins de palme appelés V0, V1, V2, V3 et V4, les analyses microbiologiques et physico-chimiques ont été réalisées sur les vins toutes les 8 heures jusqu'à 32 heures de stockage. La charge en GAM varie de $\log 7,6 \pm 0,1$ à $9,4 \pm 0,3$ UFC/mL. La charge des bactéries lactiques et levures est plus élevée dans le vin de palme V3 avec des charges respectives de $\log 7,4 \pm 0,1$ UFC/mL et de $\log 7,2 \pm 0,3$ UFC/mL. La charge des

Entérocoques en début de stockage, est plus élevée ($\log 7,7 \pm 0,2$ UFC/mL) dans le vin de palme V4. Les résultats obtenus révèlent une diminution lente et progressive du pH, des sucres totaux et des sucres réducteurs du vin de palme pendant le stockage. L'acidité titrable augmente pendant le stockage de même que la quantité de vitamine C. Le vin de palme V0 contient le taux de sucres totaux le plus élevé ($501,68 \pm 22,6$ mg/mL).

Le regroupement des différentes souches a donné 5 genres de bactéries lactiques. Parmi les cinq (5) genres de bactéries lactiques, *Lactobacillus* est dominant avec une proportion de 52,86% suivi de *Pediococcus* qui représente 31,43%. Pendant l'exploitation du vin de palme, l'espèce *Pediococcus pentosaceus* est dominante avec une proportion de 9,29% alors que pendant le stockage du vin de palme, *Lactobacillus delbrueckii* sp *bulgaricus* est la souche dominante avec une proportion de 14,29%. Par ailleurs, l'étude physiologique des isolats de *Pediococcus pentosaceus* pris au hasard a permis de révéler que toutes les souches sont homofermentaires et les isolats de *Lactobacillus pentosus* sont composés de 83,33% de souches homofermentaires et 16,67% de souches hétérofermentaires.

TABLE DES MATIERES

Pages

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS	II
RESUME.....	IV
TABLE DES MATIERES	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	XIV
INTRODUCTION.....	1
I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1- Généralités sur le palmier a huile (<i>Elaeis guineensis</i>)	5
1-1 La plante et son milieu.....	5
1-2 But de la culture	7
2- Le vin de palme.....	7
2-1 Généralités sur le vin de palme	7
2-2 Techniques de production du vin de palme	8
2-3 Importance du vin de palme.....	11
2-4 Composition physico-chimique du vin de palme	12
2-5 Microflore naturelle du vin de palme	15
2-6 Sources de contaminations de la sève du palmier.....	18
3- Différents types de fermentation	19
3-1 Définition de la fermentation	19
3-2 Fermentation et les microorganismes.....	19
3-3 Différents types de fermentation du vin de palme	21
3-3-1 Fermentation alcoolique	21
3-3-2 Fermentation lactique	22
3-3-3 Fermentation acétique	24
4- Microorganismes majoritaires dans le vin de palme.....	25
4-1 Les levures.....	25

4-1-1 Définition	25
4-1-2 Morphologie et cytologie	25
4-1-3 Classification	26
4-1-4 Méthodes d'identifications	28
4-1-4-1 Méthodes classiques ou conventionnelles	28
4-1-4-2 Méthodes moléculaires	28
4-1-4-2-1 Analyse par PCR-RFLP de la région ITS-5.8S rDNA	30
4-2- Les bactéries lactiques	32
4-2-1 Définition	32
4-2-2 Caractéristiques morphologiques et biochimiques	33
4-2-3 Taxonomie et classification	35
4-2-3-1 Classification au niveau du genre	36
4-2-4 Utilisation industrielle des bactéries lactiques.....	40
4-2-5 Importance des bactéries lactiques chez l'homme et dans l'alimentation	42
4-2-5-1 La flore commensale des bactéries lactiques	42
4-2-5-2 Inhibition de la croissance des pathogènes par production des acides organiques	44
4-2-5-3 Inhibition de la croissance des pathogènes par production de peroxyde d'hydrogène.....	44
4-2-5-4 Inhibition de la croissance des pathogènes par production de bactériocines.....	45
4-2-5-5 Effet bénéfique des bactéries sur la santé	47
4-2-5-6 Amélioration de la qualité organoleptique des aliments fermentés	49
4-2-5-7 Amélioration de la qualité nutritionnelle des aliments fermentés ..	50
4-2-6 <i>Lactobacillus</i>	50
4-2-6-1 Définition	50
4-2-6-2 Classification et taxonomie.....	51
4-2-6-3 Habitat et écologie	53
4-2-6-4 Identification des <i>Lactobacillus</i>	54
4-2-6-4-1 Identification phénotypique	54
4-2-6-4-2 Identification génotypique	56

4-2-6-4-3 Le ribotypage	56
4-2-6-4-4 Le profil plasmidique	56
4-2-6-4-5 Méthodes des empreintes digitales (fingerprinting)	57
4-2-6-4-5-1 L'électrophorèse en champs pulsé de l'ADN chromosomique digéré (Puled Field Gel Electrophoresis)	57
4-2-6-4-5-2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).....	57
4-2-6-4-5-3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 57	
4-2-6-4-5-4 repetitive extragenic palindromic- Polymerase Chain Reaction (rep-PCR).....	57
II-MATERIEL ET METHODES	59
1- Matériel biologique	60
2- Méthodes.....	60
2-1 Extraction du vin de palme sur un palmier à huile abattu.....	60
2-2 Echantillonnage.....	61
2-3 Evaluation des paramètres physico-chimiques	61
2-3-1 Mesure de l'intensité de la fermentation	61
2-3-2 Détermination du pH	63
2-3-3 Détermination de l'acidité titrable (Kimaryo et <i>al.</i> , 2000)	63
2-3-4 Détermination des sucres totaux (Dubois et al., 1956).....	64
2-3-5 Détermination des sucres réducteurs (Bernfeld, 1955).....	64
2-3-6 Détermination de la viscosité	64
2-3-7 Détermination de l'éthanol (N'guessan et <i>al.</i> , 2008).....	65
2-3-8 Détermination des acides organiques (Karadeniz, 2004)	66
2-3-8-1 Préparation des échantillons.....	66
2-3-8-2 Equipement et conditions opératoires	66
2-4 Evaluation des paramètres microbiologiques	68
2-4-1 Recherche et dénombrement des microorganismes.....	68
2-4-1-1 Préparation de la solution mère et des dilutions	68
2-4-1-2 Dénombrement des germes aérobies mésophiles (GAM).....	68

2-4-1-3 Dénombrement des levures et moisissures	68
2-4-1-4 Dénombrement des bactéries lactiques	69
2-4-1-5 Dénombrement des coliformes.....	70
2-4-1-6 Dénombrement des Entérocoques	70
2-4-1-7 Dénombrement des germes anaérobies Sulfito-réducteurs	71
2-4-1-8 Expression des résultats de la charge des microorganismes	71
3- Fermentation des carbohydrates	72
4- Traitement des données et analyses statistiques	72
RESULTATS ET DISCUSSION.....	74
Chapitre I : Variations des propriétés microbiologiques et physicochimiques du vin de palme entre des productions successives durant l'exploitation de deux variétés de palmiers a huile (<i>Elaeis guineensis</i>)	75
1- RESULTATS	75
1-1 Variations des propriétés microbiologiques	75
1-1-1 Charge en germes aérobies mésophiles (GAM), bactéries lactiques, Entérocoques et levures	77
1-1-2 Charge en coliformes et germes anaérobies sulfito-réducteurs	80
1-2 Variations des propriétés physicochimiques	82
1-2-1 Viscosité	82
1-2-2 pH et acidité titrable.....	83
1-2-3 Teneurs en sucres et en éthanol	84
1-2-4 Acides organiques.....	86
1-2-5 Analyse en composantes principales (ACP) des caractéristiques des vins de palme	89
2-DISCUSSION	92
3-CONCLUSION PARTIELLE	96
Chapitre II : Variations des propriétés microbiologiques et physicochimiques du vin de palme au cours du stockage a température ambiante (28-30°C)	97
1-RESULTATS.....	97
1-1 Paramètres microbiologiques des vins de palme	97

1-1-1 Charge en coliformes.....	99
1-1-2 Charge en GAM, bactéries lactiques, Entérocoques et des levures.....	100
1-2 Paramètres physicochimiques des vins de palme	102
1-2-1 Production de gaz et alcool dans les vins	104
1-2-2 pH et acidité titrable des vins de palme	105
1-2-3 Taux de sucres des vins de palme.....	106
1-2-4 Taux de matières sèches des vins de palme.....	107
1-2-5 Acides organiques des vins de palme	108
2-DISCUSSION	112
3-CONCLUSION PARTIELLE	115
Chapitre III : Diversité et dynamique des bactéries lactiques dans les vins de palme .	116
1-RESULTATS.....	116
1-1 Diversité des bactéries lactiques isolées	116
1-1-1 Caractères morphologiques et physiologiques des bactéries lactiques isolées des vins de palme	116
1-2 Espèces de bactéries lactiques isolées des vins de palme	116
1-2-1 Espèces identifiées par Galerie API 50 CHL	116
1-2-2 Répartition des isolats pendant l'exploitation et le stockage du vin de palme	119
1-2-2-1 Dynamique des bactéries lactiques pendant l'exploitation du vin de palme	120
1-2-2-2 Dynamique des bactéries lactiques pendant le stockage du vin de palme.....	123
2-DISCUSSION	125
3-CONCLUSION PARTIELLE	128
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	129
1- Conclusion générale.....	130
2- Perspectives.....	131
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	133

LISTE DES TABLEAUX

Pages

Tableau 1 : Composition de la sève fraîche récoltée le dixième jour d'exploitation du palmier à huile.....	14
Tableau 2 : Bactéries et levures identifiées dans le vin de palme	17
Tableau 3 : Classification des levures	27
Tableau 4 : Quelques caractéristiques de différents genres de bactéries lactiques	36
Tableau 5 : Quelques caractéristiques de bactéries lactiques.....	39
Tableau 6 : Bactéries lactiques utilisées dans la fermentation de certains aliments	41
Tableau 7 : Subdivision du genre <i>Lactobacillus</i> selon les critères phénotypiques et génotypiques	52
Tableau 8 : Solutions de référence analysées par HPLC et CPG.....	67
Tableau 9 : Microorganismes isolés des vins de palme fraîchement récoltés.....	76
Tableau 10 : Microorganismes isolés des vins de palme fraîchement récoltés par semaine.....	98
Tableau 11 : Paramètres physicochimiques déterminés des vins de palme fraîchement récoltés par semaine	103
Tableau 12 : Bactéries lactiques isolées du vin de palme	118
Tableau 13 : Proportion des espèces de bactéries lactiques isolées des vins de palme fraîchement récoltés et des vins de palme stockés à température ambiante	120

LISTE DES FIGURES

Pages

Figure 1 : Photographie d'un palmier à huile (<i>Elaeis guineensis</i>)	6
Figure 2 : Technique de production du vin de palmier sur palmier à huile (<i>Elaeis guineensis</i>) vivant	10
Figure 3 : Technique de production du vin de palme sur un palmier à huile (<i>Elaeis guineensis</i>) abattu	10
Figure 4 : Schéma de l'unité de répétition de l'ADNr et de la région ITS	32
Figure 5 : Importance des bactéries lactiques	42
Figure 6 : Méthode d'extraction du vin de palme	60
Figure 7 : Montage à lecture indirecte du volume de gaz produit au cours de la fermentation du vin de palme	62
Figure 8 : Photographie d'un viscosimètre à chute de bille	65
Figure 9 : Evolution des charges en GAM, bactéries lactiques, Entérocoques et levures des vins de palme extraits de palmiers à huile des variétés <i>Dura</i> et <i>Tenera</i> au cours de l'exploitation	79
Figure 10 : Evolution des charges en coliformes totaux, coliformes fécaux et en germes sulfite-réducteurs des vins de palme extraits de palmiers à huile des variétés <i>Dura</i> et <i>Tenera</i> au cours de l'exploitation	81
Figure 11 : Evolution de la viscosité du vin de palme frais extraits de palmiers à huile des variétés <i>Dura</i> et <i>Tenera</i> au cours de l'exploitation	82
Figure 12 : Evolution du pH et de l'acidité titrable des vins de palme extraits de palmiers à huile des variétés <i>Dura</i> et <i>Tenera</i> au cours de l'exploitation	83
Figure 13 : Evolution des sucres totaux, des sucres réducteurs et du taux d'éthanol des vins de palme extraits de palmiers à huile des variétés <i>Dura</i> et <i>Tenera</i> au cours de l'exploitation	85
Figure 14 : Evolution des acides organiques des vins de palme extraits de palmiers à huile des variétés <i>Dura</i> et <i>Tenera</i> au cours de l'exploitation	88
Figure 15 : Analyse en composantes principales (ACP) des caractéristiques microbiennes et biochimiques des vins de palme des deux variétés de palmiers	91
Figure 16 : Evolution de la charge des coliformes totaux et de coliformes fécaux des différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à températures ambiante	99
Figure 17 : Evolution de la charge des microorganismes fermentaires des différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à températures ambiante.	101
Figure 18 : Production de gaz et d'éthanol des différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à températures ambiante	105

Figure 19 : Evolution des pH et les acidités titrables des différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à températures ambiante.....	106
Figure 20 : Evolution du taux de sucres totaux et de sucres réducteurs des différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à températures ambiante.	107
Figure 21 : Evolution du taux de matières sèches des différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à températures ambiante.....	108
Figure 22 : Evolution des acides organiques dont le taux augmente dans les vins de palme pendant 32 heures de stockage à températures ambiante.....	109
Figure 23 : Evolution des autres acides organiques présents dans les différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à températures ambiante.....	111
Figure 24 : Différents genres de bactéries lactiques isolés du vin de palme	117
Figure 25 : Succession et proportion des différentes espèces de bactéries lactiques isolées pendant l'exploitation des vins de palme	122
Figure 2- : Succession et proportion des différentes espèces de bactéries lactiques isolées pendant le stockage des vins de palme V3	120

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ACP : Analyse en Composantes Principales

AT : Acidité titrable

ATCC : American Type Culture Collection

CF : Coliformes Fécaux

CT : Coliformes Toatux

DNS : acide 3,5-Dinitrosalicylique

dXTP: Désoxyribonucléotide Triphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

ENT : Entérocoques

g/L: Gramme par Litre

GAM : Germes Aérobie Mésophile

H: Heure

ITS : Internal Transcribed Spacer (Espace Interne Transcrite)

LAB : *Lactobacillus*

LEV : Levures

ml : millilitre

MS : Matières sèches

Mg/100 ml : Milligramme pour 100 millilitre

Mg/mL : Milligramme par Millilitre

mM : Millimolaire

MRS: Man Rogosa Sharpe

N_{NaOH} : Normalité de la solution d'hydroxyde de sodium

R : Reverse (non sens)

RAPD : Amplification Aléatoire du Polymorphisme de l'ADN (Randomly Amplified Polymorphism DNA)

REA : Analyse de Restrictions Endonucléasiques (Restriction Endonucleases Analysis)

REP-PCR : PCR des séquences Répétées du Palindrome Extragénique (Repeated sequence Extragenic Palindrom-PCR)

RFLP : Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism)

SR : sucres réducteurs

ST : sucres totaux

TBE : Tris-Borate-EDTA

TE : Tris-EDTA

U : Unité enzymatique

μM : Micromolaire

V_{NaOH} : Volume de la solution d'hydroxyde de sodium

Vit C : Vitamine C

Vol : Volume

Introduction

Le vin de palme est une boisson obtenue à partir de la sève fermentée de plantes monocotylédones tropicales de la famille des *Palmacées* telles que le palmier à l'huile (*Elaeis guineensis*), le palmier rônier (*Borassus aethiopicum*), le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), le palmier nipa (*Nypa fruticans*), le palmier kithul (*Caryota urens*) et le palmier raphia (*Raphia hookeri*) (Area, 1992; Sanni et Lonner, 1993; Ejiofor et *al.*, 1994; Ayogu, 1999; Sambou et *al.*, 2002; Nwachukwu et *al.*, 2006 ; Dayo-Owoyemi et *al.*, 2008). C'est une boisson alcoolique produite et consommée en très grande quantités dans les régions tropicales où elle est connue sous différentes appellations à savoir "matango", "fitchuk," et "mbu" au Cameroun, "doka" au Ghana, "toddy" en Inde, "emu" au Nigéria ", lambanog" aux Philippines, et "panam culloo" en Chine, "bandji" en Côte d'Ivoire (Noll, 2008). Elle représente en Afrique un intérêt socio-économique très important.

En effet, dans diverses sociétés traditionnelles africaines, le vin de palme joue un rôle significatif dans les pratiques coutumières. Il est souvent attaché aux traditions d'hospitalité et de convivialité et fait partie du savoir vivre de la plupart des familles. De plus, il permet de sceller les relations entre les individus. Populaire et très utilisée dans les cérémonies (fêtes, mariages, funérailles...), cette boisson traditionnelle est consommée par plus de 10 millions de personnes en Afrique de l'Ouest (FAO, 1998). Les volumes consommés y sont de même ordre de grandeur que ceux de la bière (Tchiendji, 1985). En raison de la richesse nutritionnelle de la sève non fermentée, elle est souvent proposée à l'enfant dont la mère ne peut produire suffisamment de lait pour l'allaitement (Ayernor et Mathews, 1971; Ezeagu et Fafunso, 2003).

Dans divers pays d'Afrique et au-delà , la sève du palmier est extraite et subit une fermentation spontanée, ce qui favorise la prolifération des espèces de levures qui convertissent le substrat sucré en une boisson alcoolisée contenant des éléments nutritifs importants, notamment des acides aminés , des protéines, des vitamines et des sucres (Okafor, 1972). Le processus d'extraction du vin de palme implique différentes étapes dont l'abattage de l'arbre, une période de repos de l'arbre abattu d'environ deux (2) semaines permettant une concentration de la sève, puis l'extraction durant environ 8 semaines. Pour l'extraction du vin, une incision est faite dans l'arbre à travers laquelle un tube de bambou est inséré permettant de recueillir la sève dans un récipient généralement en matière plastique (Hartley, 1984; Okraku - Offei, 1968). De nombreux problèmes liés aux différents aspects des processus de fermentation des aliments

traditionnels ont été relevés. Il s'agit entre autres du manque des bonnes pratiques de fabrication ou d'hygiène, la non maîtrise du processus de fabrication, l'absence de contrôle de certains paramètres (le pH, la température, l'humidité et la qualité de l'eau), le manque de connaissance de l'implication nutritionnelle et toxicologique de la fermentation. Ces problèmes sont d'une importance capitale avec une référence particulière au processus d'extraction et de fermentation du vin de palme, en ce que la qualité est déterminée entre autres par la maîtrise du processus d'exploitation ou l'efficacité de la fermentation.

Pour être acceptable par la plupart des consommateurs, le vin de palme ne doit pas seulement avoir une apparence blanchâtre et un goût sucré agréable, mais doit également présenter une vigoureuse effervescence. Du fait que les microorganismes présents dans le vin sont vivants, ils métabolisent le goût sucré agréable du vin frais et produisent divers acides organiques (Bassir, 1962; Faparusi et Bassir, 1972; Van Pee et Swings, 1971). Ainsi, si le vin de palme recueilli n'est pas consommé dans un délai court, il subit d'importantes modifications de ses qualités nutritionnelles, organoleptiques et sanitaires, alors il commence à développer un goût vinaigré inacceptable pour les consommateurs. En effet, l'observation du vin de palme retient immédiatement l'attention du microbiologiste. L'aspect floconneux, laiteux et effervescent du breuvage laisse présager la présence d'une forte densité de microorganismes et une activité biologique intense. La contamination microbienne de la sève du palmier se fait avant qu'elle ne soit rassemblée dans les pots de récolte. Les microorganismes observés dans le vin de palme sont donc introduits pendant la collecte de la sève et sont composés de microorganismes de l'environnement dominés particulièrement par les bactéries lactiques et des levures. Il a été démontré que ces microorganismes possédaient des propriétés biologiques intéressantes (Vandamme et *al.*, 1996 ; Soomro et *al.*, 2002 ; Bergqvist et *al.*, 2005). Ils ont des propriétés inhibitrices contre la flore indésirable, pathogène et permettent d'augmenter la durée de conservation des aliments. Ils améliorent aussi les qualités organoleptiques, nutritionnelles des aliments et exercent un effet bénéfique sur la santé des hommes et des animaux (Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Soomro et *al.*, 2002 ; Rosenfeldt et *al.*, 2004 ; Bergqvist et *al.*, 2005). Les espèces telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* ont été rapportées comme les espèces dominantes des levures dans le vin de palme (Odunfa et Oyewole, 1998). Par ailleurs, le vin de palme est consommé sans élimination de ses microorganismes dont la teneur se situe entre 10^5 - 10^7 UFC/ml pour les levures et entre 10^5 - 10^9 UFC/ml pour les bactéries lactiques

sans qu'aucune toxicité n'ait été démontrée ; ce qui milite naturellement pour leur innocuité (Amoa-Awua et *al.*, 2007).

De nombreuses études ont été réalisées au Nigéria et dans plusieurs autres pays africains au cours des 20 dernières années sur divers aspects du vin de palme (Okafor, 1978; Van Pee et Swings, 1971). Mais jusqu'à présent, très peu d'études publiées sur les changements biochimiques et microbiologiques dans le vin ont été signalées, et même aucunes sur la quantification de la valeur nutritionnelle au cours du stockage. Comme le vin de palme joue un rôle important dans les pratiques coutumières en Afrique, il est important que la microbiologie et la biochimie de son processus de fermentation soient bien comprises.

Ainsi, ce travail a-t-il été réalisé afin d'évaluer les modifications des caractéristiques biochimiques, microbiologiques et suivre la dynamique des bactéries lactiques au cours de la production et du stockage du vin de palme tiré à partir de deux variétés de palmiers.

Il s'est agi spécifiquement de :

- Evaluer les variations des propriétés microbiologiques et physicochimiques du vin de palme entre des productions successives durant l'exploitation de deux variétés de palmier à huile (*Elaeis guineensis*).
- Evaluer les variations des propriétés microbiologiques et physicochimiques du vin de palme pendant le stockage à température ambiante (28-30°C).
- Evaluer la diversité et dynamique des bactéries lactiques dans les vins de palme.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Généralités sur le palmier à huile (*Elaeis guineensis*)

1-1 La plante et son milieu

La répartition du palmier à huile en Afrique occidentale s'étend du Sénégal à l'Angola où existent des peuplements naturels exploités depuis toujours par les populations à des fins multiples, essentiellement alimentaires, artisanales, pharmaceutiques, religieuses, etc. Il a été décrit pour la première fois par le botaniste JACQUIN en 1763, (Aka et *al.*, 2008). De fortes densités de peuplements et les principales aires de cultures industrielles s'observent en Sierra Léone, Malaisie, Indonésie, Libéria, Côte d'Ivoire, Ghana, Bénin, Nigeria, Congo Kinshasa, Cameroun, Brésil et en Océanie (Anonyme , 2002). Le genre *Elaeis* comprend deux espèces principales dont l'une africaine, *E. guineensis* ou palmier à huile, et l'autre amazonienne, *E. oleifera*, appelée aussi *E. melanococca* (Gaertner). La classification des variétés selon Jacquemard (1995), peut se faire principalement suivant 3 caractères que sont l'épaisseur de la coque, la présence ou l'absence de caroténoïdes dans la pulpe à maturité et l'origine du matériel végétal. Ce sont donc entre autres :

- la variété *Dura* à coque épaisse (supérieure à 2 mm) ;
- la variété *Pisifera* dépourvue de coque, en général stérile donc sans intérêt économique mais utilisée en sélection ;
- la variété *Tenera* à coque mince.

Il faut noter que la variété *Tenera* est un hybride des deux autres variétés, *Dura* et *Pisifera* et qu'elle présente des avantages économiques grâce à son pourcentage élevé de pulpe. Des palmiers cultivés en plantations industrielles sont des variétés hybrides *Tenera* (FAO, 1998). Le système racinaire est du type fasciculé. Plusieurs milliers de racines cylindriques partent d'un énorme bulbe ou plateau racinaire assurant un ancrage très solide du palmier. On rencontre les plus courtes (1 m) et les plus longues (15 à 20m). Ces dernières portent des racines absorbantes tertiaires et quaternaires. La majeure partie de ces racines rayonnent horizontalement dans les premiers cinquante centimètres du sol et s'étendent jusqu' à l'aplomb des feuilles les plus basses du stipe, dans un rayon de 3,5 à 4,5 m. (Anonyme, 1998). Le tronc du palmier à huile est cylindrique, vertical, non ramifié, recouvert de chicots (les bases pétiolaires) au préalable. Par la suite, une couche subéreuse de production remplace les bases pétiolaires qui disparaissent progressivement. Il commence à se développer vers 4 ou 6 ans, à une croissance constante de 40 à 60 cm par an. Vers l'âge de 18 à 20 ans, le tronc est lisse sur presque toute sa longueur, sauf à

la base et près de la couronne foliaire. Il est constitué de fibres enserrant une moelle alimentant le bourgeon végétatif terminal. Pendant toute sa vie le palmier peut atteindre 20 à 25 m de haut. (Anonyme, 2002).

Le vin de palme peut être obtenu à partir de plusieurs types de palmiers dont le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), le palmier kithul (*Caryota urens*), le palmier rônier (*Borassus aethiopum*), le palmier raffia (*Raphia hookeri*) et le palmier à huile (*Elaeis guineensis*) (Area, 1992 ; Ejiofor et *al.*, 1994; Ayogu, 1999; Sambou et *al.*, 2002 ; Nwachukwu et *al.*, 2006, Dayo-Owoyemi et *al.*, 2008). La figure 1 présente un palmier à huile.



Figure 1 : Photographie d'un palmier à huile (*Elaeis guineensis*) (Karamoko Detto)

1-2 But de la culture

Le palmier à huile est une plante oléagineuse originaire d'Afrique. Son foyer se situe le long du golfe de Guinée. Il est cultivé principalement dans les pays asiatiques (Malaisie, Indonésie, etc.) qui représentent environ 90 % de la production mondiale en huile de palme avec plus de 3.500.000 tonnes (Indonésie et Malaisie environ 70 % de la production mondiale des palmistes et d'huile de palme) (Yao, 2007). Il est également cultivé dans certains pays d'Afrique notamment le Nigéria, la République Démocratique du Congo, la Côte d'Ivoire, le Cameroun, le Benin et plus récemment en Amérique centrale et en Amérique du Sud (Yao, 2007).

La Côte d'Ivoire, avec une production en 2003 estimée à 250.000 tonnes d'huile de palme, est l'un des pays africains ayant la plus forte production grâce aux superficies cultivées et aux rendements à l'hectare (Yao, 2007). Le palmier à huile occupe une place importante dans l'industrie de l'huilerie et donc dans l'économie nationale. Ces performances réalisées s'expliquent par une bonne maîtrise des différentes opérations liées à la culture du palmier depuis la préparation du matériel végétal jusqu'à la récolte. Le palmier à huile est cultivé pour ses fruits dont on extrait des corps gras à usages alimentaires et industriels. Il produit cinq à sept fois plus d'huile à l'hectare que l'arachide, le soja, etc. (Anonyme, 1998).

La pulpe du fruit donne de l'huile de palme. Cette huile a une couleur qui varie du jaune orangé au rouge orangé. Elle sert comme huile de table, pour la fabrication de margarine, de savons, pour l'extraction du carotène, pour le laminage à froid des tôles minces, etc. L'amande des fruits donne de l'huile de palmiste. Elle a une couleur jaune clair. Elle se digère moins facilement que l'huile de palme, mais elle contient des protides très intéressants. Les feuilles sont utilisées pour la confection des toitures, des clôtures, des vannes, des fauteuils, etc. (Paul, 1970).

2- Le vin de palme

2-1 Généralités sur le vin de palme

Le vin de la palme est la sève fermentée obtenue à partir de plantes monocotylédones rencontrées dans la zone intertropicale (Afrique, Asie et Amérique du Sud), telles que le palmier à l'huile (*Elaeis guineensis*), le palmier-rônier (*Borassus aethiopium*), le palmier nipa, le palmier kithul, le palmier dattier et le palmier raphia (*Raphia hookeri*) appartenant tous à la famille des

palmacées (Ejiofor et *al.*, 1994; Ayogu, 1999; Nwachukwu et *al.*, 2006). Cette boisson est connue partout dans les majeures parties d'Afrique sous plusieurs noms, tels que « mimbo » au Cameroun, « nsafufuo » au Ghana, « ému » au Nigeria (Jespersen, 2003) et « bandji » en Côte d'Ivoire. Le prélèvement de la sève s'effectue selon deux méthodes : soit sur la souche après avoir abattu l'arbre (méthode utilisée en Côte d'Ivoire), soit sur l'arbre vivant à partir des saignées réalisées sur les inflorescences ou sur le tronc (méthode communément pratiquée au Nigeria et au Bénin) (Okafor, 1975 ; Uzochukwu et *al.*, 1994 ; Uzochukwu et *al.*, 1999). La récolte du vin de palme au Cameroun, au Ghana et en Côte d'Ivoire implique d'abord l'abattage de l'arbre. L'arbre abattu est laissé pour une période approximative d'une semaine pour que la sève se concentre et le palmier peut être exploité sur huit (8) semaines. Après la récolte, si le vin de palme n'est pas consommé en quelques jours, il devient aigre et indésirable aux consommateurs (Marzia et *al.*, 2009). Le vin de palme est une boisson blanchâtre, effervescente, alcoolisée obtenue par la fermentation spontanée de la sève sucrée de palmiers par des levures et des bactéries lactiques. Il est produit et consommé en grande quantité en Afrique de l'Ouest. Il contient une suspension importante de levure et de bactéries, donnant ainsi une apparence laiteuse au vin de palme (Olusegun et *al.*, 2007).

La sève qui sert à l'obtention du vin de palme est la sève élaborée qui contrairement à la sève brute migre en courant descendant. Cette sève recueillie quotidiennement à raison de 3 à 4 litres en moyenne par arbre est riche en sucres, en vitamines et en acides aminés (Heller, 1981). Naturellementensemencée par des microorganismes de l'environnement, la sève s'enrichit en levures et bactéries lactiques de l'environnement qui fermentent les sucres. Après quelques heures, elle devient donc une boisson pétillante, légèrement alcoolisée et acidulée, chargée en microorganismes (Bassir, 1962). Le vin de palme se rencontre dans toutes les régions du globe où poussent les différentes espèces de palmiers, plus précisément dans la zone forestière intertropicale d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud (Olusegun et *al.*, 2007).

2-2-Techniques de production du vin de palme

Le prélèvement de la sève s'effectue sur l'arbre vivant à partir des saignées réalisées sur les inflorescences immatures ou sur le tronc. En effet, trois à six inflorescences sont attachées ensembles et insérées dans un récipient approprié pour la collecte de la sève. Cela est communément pratiqué au Nigeria et au Bénin. Par contre, au Cameroun, au Ghana et en Côte d'Ivoire, le processus de la récolte du vin de palme implique d'abord l'abattage de l'arbre. L'arbre

abattu est laissé pendant une période approximative d'une semaine pour que la sève se concentre (Marzia et *al.*, 2009).

La récolte du vin de palme se fait principalement selon deux techniques de production. La première consiste à grimper sur les palmiers pour exploiter les bourgeons terminaux et les inflorescences situés au sommet des palmiers, souvent à plus de dix (10) mètres du sol. Elle consiste à couper en haut de l'arbre, une partie de la spathe, puis à pratiquer des incisions horizontales sur la tige au niveau du bourgeon terminal. Pendant l'exploitation du vin de palme, un trou d'environ 5 cm est creusé dans la spathe. Pour la méthode traditionnelle, un long bambou est fixé au niveau du trou, d'où la sève s'écoule et verse dans un entonnoir, qui fait couler la sève dans une bouteille ou un pot en terre cuite. Après l'exploitation du vin de palme, le palmier subit une malformation et ne peut plus grandir. L'exploitation du palmier s'arrête lorsque le méristème apical est complètement détruit (Cunningham, 1990 ; Aidoo et *al.*, 2006). A chaque collecte (matin et soir), une nouvelle entaille est pratiquée dans la « planche de gemmage ». La sève recueillie, sur les inflorescences mâles, produit en moyenne trois à quatre litres de vin de palme par collecte et est très apprécié comme boisson au cours des fêtes africaines. Une telle activité présente un risque car elle oblige à monter plusieurs fois par jour en haut des palmiers et les chutes ne sont pas à négliger. Cette sève recueillie est la sève de première catégorie. Cette technique permet une récolte pendant un mois (Anonyme, 1986). La seconde technique consiste à extraire directement le vin de palme d'un arbre abattu que l'on taille régulièrement pour en recueillir la sève. Les branches sont coupées au maximum puis le tronc est laissé élaguer deux ou trois semaines. Un trou est percé à l'extrémité supérieure sur le cœur du palmier où se trouve le bourgeon terminal et à l'aide d'un tuyau en bambou placé dans ce trou un liquide blanchâtre est recueilli. Des branches coupées et taillées sont disposées pour protéger le trou de la poussière et des contaminations. Avant la collecte du vin de palme, le cœur du palmier est chauffé afin de réduire la flore microbienne et permettre à la sève de s'écouler facilement. Au fur et mesure que les jours passent, le trou s'agrandi (Rongier, 2004). La sève recueillie est de seconde catégorie parce qu'à la différence de celle issue du gemmage d'une inflorescence male immature elle contient en plus de l'éthanol, du méthanol et du propanol (Assiedu, 1991). Les figures 2 et 3 présentent les différentes techniques de production du vin de palme.



Figure 2 : Technique de production du vin de palme sur un palmier à huile (*Elaeis guineensis*) vivant (Karamoko Detto).



Figure 3 : Technique de production du vin de palme sur un palmier à huile (*Elaeis guineensis*) abattu (Karamoko Detto).

2-3 Importance du vin de palme

Le vin de palme est consommé par plus de 10 millions de personnes en Afrique de l'Ouest, et à un niveau moindre en Asie, au Moyen-Orient, en Amérique du Sud, et au Nord de l'Afrique (Ukhum et *al.*, 2005). En raison de sa popularité mondiale, le vin de palme est connu sous une diversité de noms à savoir "Matango", "Fitchuk," et "Mbu" au Cameroun, "Doka" au Ghana, "Toddy" en Inde, "Emu" au Nigeria ", "Lambanog" aux Philippines, et "Panam culloo" en Chine , "bandji" en Côte d'Ivoire, pour ne citer que ceux là (Noll, 2008).

Il est apprécié lors des célébrations des naissances, des veillées funèbres, et joue un rôle de premier plan lors des cérémonies de mariages traditionnels. Le vin de palme fraîchement recueilli est, entre autres, utilisé en remplacement du lait maternel, traite la conjonctivite, et améliore la vue. Les guérisseurs traditionnels africains utilisent souvent le vin de palme avec des herbes médicinales pour produire une grande variété de remèdes (Mbuagbaw et *al.*, 2012).

Le vin de palme joue également un rôle important dans le tissu social et dans le secteur rural. Dans certains villages du Cameroun, il est toujours prévu une certaine quantité de vin de palme au chef du village. En outre, l'acte de partage du vin de palme avec le chef du village est considéré comme un signe de fidélité et d'hommage (Mbuagbaw et *al.*, 2012). Le vin de palme offert à quelqu'un symbolise de longue date de gratitude et cela est très important dans les affaires et les relations personnelles. La vie sociale dans les villages tourne autour du kiosque du vin de palme et ces endroits jouissent d'une popularité semblable aux salons de café et de thé européens (Awasum, 2012). Enfin, le vin de palme est tellement important qu'une musique populaire, "meringue" est désigné comme la musique de vin de palme en Sierra Leone (Collins, 1989).

Historiquement, les récoltes du vin de palme et sa consommation ont été découragés par la plupart des gouvernements coloniaux et post-coloniaux, parce ce vin concurrençait les boissons venant de l'occident (Mbuagbaw et *al.*, 2012). Cependant, l'importance économique de l'industrie du vin de palme dans un pays comme le Cameroun ne doit pas être négligée. Elle emploie près des trois quarts de la population masculine dans certains villages, fournissant un revenu mensuel de 20 000 à 35 000 Frs CFA aux producteurs du vin de palme (Mbuagbaw et *al.*, 2012). Un village peut produire environ 10 000 litres de vin de palme par jour. Au Nigéria, le revenu par habitant de producteurs du vin de palme est estimé et égal au revenu par habitant du pays. Jusqu'à environs deux millions de tonnes de vin de palme sont produits par an. Le commerce du vin de palme représente une importante source de revenus dans l'Ouest de l'Afrique (Lebbie et *al.*, 2002 ; Ezeagu et Fafunso, 2003).

En Côte d'Ivoire, le vin de palme occupe une place prioritaire par rapport aux autres boissons disponibles, excepté l'eau. Dans tous les villages, le vin de palme est le plus fréquemment cité comme boisson la plus importante. Plus de 61% des personnes accordent la priorité au vin de palme, devant les sucreries (limonades industrielles) avec 23,3% des réponses, le vin rouge avec 5,7%, la bière avec 4,1%, l'eau de vie avec 1,2% et les autres boissons avec 4,5%. Les raisons principales évoquées pour cette forte préférence sont la tradition (31%), la saveur (24%) et le prix (6%) (Matthias, 1999).

Le vin de palme est une des boissons les plus importantes dans les régions rurales de la Côte d'Ivoire. Cette préférence générale pour le vin de palme se reflète dans le comportement des consommateurs. Environ 80% des personnes indiquent qu'ils boivent au moins une fois par semaine du vin de palme. La consommation se répartit à parts plus ou moins égales pour les trois espèces de palmiers. Dans la savane et dans la zone de transition entre savane et forêt 81% des personnes boivent du vin de palme de *Borassus aethiopum* ; dans les trois zones, 78% consomment du vin d'*Elaeis guineensis* et dans la zone forestière 77% boivent du vin de *Raphia hookeri*. Les raisons que les personnes invoquent pour la consommation de vin de palme sont : l'alimentation, la source d'énergie pour les durs travaux champêtres, les cérémonies, l'agrément et d'autres, comme par exemple la préparation de médicaments (Assiedu, 1991).

2-4 Composition physicochimique du vin de palme

Le pH du vin de palme frais est de 7-7,4. Dans la première phase de fermentation, il tombe à 6,8 pour n'atteindre que 4 au cours de la dernière phase ; c'est-à-dire quand la fermentation se termine (Assiedu, 1991). C'est d'abord une boisson transparente, sucrée et rafraîchissante, qui contient jusqu'à 20% de sucres et quelques traces d'alcool. Lorsque la sève du palmier est fermentée, elle devient blanchâtre avec un pH approximatif de 3,6 et la teneur en alcool maximal d'environ 4% n'est obtenue qu'après 12 à 18 heures de fermentation (Olusegun et al., 2007). Généralement, le vin de palme se boit après environ 12 heures de fermentation, lorsque son pH est de 5,5-6,5. Il contient une quantité très importante de bactéries lactiques et de levures. Ces microorganismes métabolisent les sucres contenus dans le vin frais dans 36-48 heures et produisent plusieurs acides organiques et alcools (Olusegun et al., 2007). Selon Bassir (1968), les acides organiques contenus dans le vin de palme comprennent les acides acétiques, lactiques et tartriques. Treize acides aminés ont également été identifiés ainsi qu'une teneur appréciable en vitamine C et D. Elle contient essentiellement des glucides (50 à 200 g/L), des acides aminés et

amides (0,5 à 5 g/L) et des minéraux parmi lesquels, le potassium est dominant (Heller, 1981). Au cours de la fermentation, la composition de la sève initiale varie considérablement. La microflore naturelle présente, fermente rapidement les glucides en alcools, dioxyde de carbone (CO₂) et acides organiques, dont l'accumulation entraîne une chute du pH (Ayernor et Matthews, 1971 ; Faparusi, 1973).

Les analyses des alcools du vin de palme ont révélé, outre la présence d'éthanol, celle d'alcool isobutanol, de butanol-1, de propanol d'acétate d'éthyle et de traces de méthanol (Ayernor et matthews, 1971). Il a été montré par Simonart et Laudelout (1975) que la concentration en éthanol varie dans le temps avec un optimum après 24 heures de fermentation. Les jours suivants, la diminution de la concentration en éthanol, attribuée à l'oxydation biologique de ce composé en acétate, est d'autant plus rapide que le vin est conservé au contact de l'air. Le vin de palme est aussi riche en vitamines B₁ (25 µg/L), B₂ (35 µg/L) et B₆ (4 µg/L), alors que la vitamine C, initialement présente à forte concentration dans la sève, disparaît au cours de la fermentation (Bassir, 1968). Van Pee et Swings (1971) apportent un complément d'informations en précisant que la vitamine B₁₂ s'accumule également dans le vin, atteignant une concentration de 190 à 280 µg/L après 24 heures de fermentation (Tableau 1).

De plus, le vin de palme, en plus de l'alcool et du sucre contient encore d'autres composantes de valeur comme les vitamines (B₁, B₂, Niacine, C) et des oligo-éléments (K, Mg, Fe, Ca). La consommation habituelle dans les zones étudiées en Côte d'Ivoire permet de couvrir en moyenne 12% des besoins énergétiques, 7% des besoins en vitamines B₁ et B₂, 14% des besoins en Niacine et la totalité des besoins en vitamine C. Pour les oligo-éléments les valeurs suivantes ont été déterminées, 2% des besoins en Ca²⁺, 9% des besoins en Mg²⁺ et Fe²⁺ et jusqu'à 31% des besoins en K⁺ (Matthias, 1999).

Uzochukwu et *al.*, (1994, 1997, 1999) ont identifié 82 composants volatiles dans le vin de palme et ont présenté les rôles de levures et de bactéries lactiques sur les composants volatiles du vin de palme. Aussi, Jirovetz et *al.*, (2001) ont rapporté aussi les composés organiques volatiles de différentes espèces du vin de palme au Cameroun. Cependant, les composés chimiques à base d'arôme du vin de palme n'ont pas été fournis dans toutes ces études. Les nombreuses enquêtes menées par Buettner (2004) ; Buettner et Schieberle (2001) ont montré que l'élucidation chimique des arômes du vin de palme nécessite souvent des moyens très importants.

Tableau 1 : Composition de la sève fraîche récoltée le dixième jour d'exploitation du palmier à huile

(Assiedu, 1991; Chandrasekhar et *al.*, 2012)

Constituants du vin de palme	Concentration massique (%)
Acide ascorbique	16
Saccharose	4,3
Fructose	1,2
Raffinose	0,8
Protéine	0,23
Cendre	0,11
Cuivre	0,286
Manganèse	0,140
Calcium	82,3
Sodium	50,1
Plomb	3,1
Zinc	0,51
Potassium	66,9
Lithium	1,3
Nitrate	23
Glucose	3,4
Ammoniaque (NH ₃)	0,038
Acide lactique	2,1
Acide acétique	1,9
Alcool	5-8

2-5 Microflore naturelle du vin de palme

Au cours de la fermentation de la sève de palme, les modifications rapides de paramètres physicochimiques créent une pression de sélection sur la flore initiale. En début de fermentation, l'abondance de nutriments tels que le saccharose, les acides aminés et les vitamines de la sève du palmier, permettent la croissance de nombreuses espèces de levures et bactéries. Cependant, le pH proche de la neutralité favorise plus la croissance des bactéries que celles des levures. Après 48 heures de fermentation, le pH atteint sa valeur minimale (environ 3,5 à 4) et sa concentration en éthanol est maximale (Okafor, 1978). Ainsi, seule la microflore acidophile et résistante à des taux d'éthanol peut subsister. Et cette flore est principalement constituée de levures du genre *Saccharomyces* et de bactéries appartenant aux genres *Streptococcus*, *Leuconostoc* (Okafor, 1978).

L'espèce de levures impliquées dans les fermentations d'aliments et de boissons fermentées est *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, dans la fermentation spontanée du vin de palme, *Saccharomyces cerevisiae* coexiste avec d'autres microorganismes tels que les bactéries lactiques qui sont reconnues pour leurs rôles importants dans la fermentation et la conservation d'une grande variété d'aliments, alors que les bactéries acétiques permettent le développement du goût de vinaigre dans le vin de palme (Amoa-Awua et al., 2007). La diversité dans la composition des levures, de la microflore et de la nature du substrat contribuent considérablement à la qualité sensorielle du vin de palme (Sipiczki et al., 2001; Ferreira et al., 2002).

Par ailleurs, les bactéries lactiques ne sont généralement pas des microorganismes pathogènes mais ont des propriétés biologiques intéressantes, largement exploitées dans de nombreux procédés industriels (Desmazeaud, 1996 ; Vandamme et al., 1996 ; Soomro et al., 2002 ; Bergqvist et al., 2005). Elles ont, en effet, des propriétés inhibitrices contre la flore indésirable et pathogène des aliments et permettent donc d'augmenter la durée de conservation de ces aliments. Elles améliorent aussi les qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments et exercent un effet bénéfique sur la santé des hommes et des animaux (Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Soomro et al., 2002 ; Rosenfeldt et al., 2004 ; Bergqvist et al., 2005). Les espèces telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* ont été rapportées comme les espèces dominantes des levures (Odunfa et Oyewole, 1998); les autres espèces de levures telles que *Kloeckera apiculata*, *Candida krusei*, et autre *Candida* spp., *Pichia* spp. et les bactéries telles que *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* spp, *Micrococcus* spp, *Sarcina* et autre *cocci* ont aussi été détectées dans le vin de palme (Atacador-Ramos, 1996 ; AmoA-Awua et al., 2007).

Ces dernières années, les méthodes de cultures indépendantes basées sur les techniques de biologie moléculaire ont été développées pour étudier la dynamique des populations microbiennes. Aujourd'hui, les méthodes sont particulièrement attirantes, parce qu'elles fournissent plus d'informations et permettent une découverte rapide des microorganismes par rapport aux analyses microbiologiques classiques (Head et *al.*, 1997; Rappe et Giovannini, 2003; Ercolini, 2004) (Tableau 2).

Tableau 2 : Bactéries et levures identifiées dans le vin de palme
(Faparusi, 1973 ; Okafor, 1978 ; Tchiendji, 1985 ; Aidoo et *al.*, 2006 ; Law et *al.*, 2011)

Microorganismes isolés du vin de palme
Les bactéries
<p><i>Lactobacillus fermentum</i> ; <i>Lactobacillus buchneri</i> ; <i>Lactobacillus plantarum</i> ; <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Lactobacillus brevis</i> ; <i>Streptococcus</i> spp ; <i>Streptococcus faecium</i> ; <i>Leuconostoc</i> spp ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; <i>Pediococcus</i> sp ; <i>Micrococcus</i> sp ; <i>Acetobacter</i> sp ; <i>Acetobacter roseum</i> ; <i>Acetobacter xylinum</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Bacillus</i> sp ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Brevibacterium</i> sp ; <i>Clostridium perfringens</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Sarcina</i> sp ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Staphylococcus epidermitidis</i> ; <i>Scetobacter</i> sp ; <i>Serratia</i> spp ; <i>Serratia marcescens</i> ; <i>Streptomyces</i> sp ; <i>Zymomonas congensis</i> ; <i>Zymomonas mobilis</i>.</p>
Les levures
<p><i>Saccharomyces</i> spp ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Saccharomyces chevalieri</i> ; <i>Saccharomyces pastorianum</i> ; <i>Saccharomyces ellipsoïdes</i> ; <i>Saccharomyces markii</i> ; <i>Saccharomyces florentus</i> ; <i>Saccharomyces vafer</i> ; <i>Saccharomyces ludwigii</i> ; <i>Saccharomyces bailii</i> ; <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ; <i>Hansenula anomala</i> ; <i>Candida</i> spp ; <i>Candida valida</i> ; <i>Candida paropsilosis</i> ; <i>Candida tropicalis</i> ; <i>Torulopsis</i> spp ; <i>Kloeckera javanica</i> ; <i>Pichia etchellsii</i> ; <i>Pichia farinose</i> ; <i>Pichia guilliermondii</i> ; <i>Pichia membranaeficiens</i> ; <i>Pichia ohmeri</i> ; <i>Rhodotorula glutinis</i> ; <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> ; <i>Candida cacaoi</i> ; <i>Edomycopsis</i> sp ; <i>Kloeckera apiculata</i> ; <i>Pichia fermentans</i> ; <i>Pichia pastori</i> ; <i>Pichia membranaeficiens</i> ; <i>Sporobolomyces</i> sp ; <i>Torulopsis globosa</i> ; <i>Torulopsis versatilis</i> ; <i>Zygosaccharomyces rouxii</i></p>

2-6 Sources de contaminations de la sève du palmier à huile

L'étude microbiologique de Faparusi (1973) sur la sève du palmier dans des conditions aseptiques les plus strictes possibles (récipients et appareillages de récoltes stériles), montre des niveaux de populations de levures et de bactéries significativement plus faible que ceux estimés par les autres chercheurs (Tableau 2). Cette observation semble indiquer que l'ensemencement du vin de palme ne se fait pas seulement par la blessure effectuée dans l'arbre, mais se fait également par les outils contaminés du récolteur, l'eau de rinçage du matériel et le liquide résiduaire des récipients de collecte de la sève.

La présence d'entérobactéries appartenant aux genres *Escherichia*, *klebsiella* et *Serratia*, mais aussi de souches identifiées à *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus epidermidis* et au genre *Micrococcus* (Tchiendji, 1985) démontre l'apport extérieur de microorganismes par l'activité du récolteur.

En effet, ces bactéries se trouvent naturellement dans le sol, l'eau et sur la peau de l'homme. Les microorganismes apportés par les nombreux insectes attirés par les sucres de la sève constituent également une des multiples sources de contaminations de la sève du palmier. De plus, la présence de *Bacillus* sp et *Enterococcus faecalis* dans le vin de palme est une preuve des conditions d'hygiène dans lesquelles sont exploités les vins de palme. Ces microorganismes peuvent être les contaminants des eaux non stérilisées utilisées pour la dilution des vins de palme par le récolteur, dans le but d'augmenter le volume du vin récolté et aussi *Enterococcus faecalis* indique une contamination fécale (Wang et al., 2004). Pour tenter d'expliquer la microflore dominante de la sève du palmier issue des palmeraies du Nigéria, Faparusi (1973) a étudié la microflore dominante du vin présente sur les palmiers. Il a observé que la grande majorité des espèces de levures et bactéries constituant la microflore dominante du vin est présente sur le feuillage et les bourgeons des arbres. Il en conclut alors que la microflore qui contamine directement la sève au niveau des saignées réalisées par le récolteur, constitue la principale source de contamination de la sève récoltée. Okafor (1978) précise que la microflore que l'on trouve dans le vin de palme est initialement dans l'écorce au contact de la saignée. De plus, la présence des microorganismes dans le vin de palme est due aux caractéristiques génétiques et métaboliques du palmier à huile et aux facteurs environnementaux. En général, les différentes méthodes d'exploitation et de collectes influencent les microorganismes présents dans le vin de palme (Ayernor et Matthews, 1971; Amoa-Awua et al., 2007; Naknean et al., 2010).

3 Différents types de fermentation

3-1 Définition de la fermentation

La fermentation est une dégradation de la matière organique contenant du sucre et qui se fait en absence d'oxygène. Elle est l'une des plus anciennes méthodes de conservation des aliments. Elle est caractérisée à la fois par des modifications chimiques considérables de la matière première et par le fait que les agents conservateurs se forment au sein même du produit grâce à l'action des microorganismes (Babacar, 2002).

Au plan biochimique, la fermentation est un processus d'oxydoréduction au cours duquel des composés organiques, source d'énergie et de carbone servent de donneurs et d'accepteurs d'électrons et de protons (Guiraud *et al.*, 1998).

3-2 Fermentation et les microorganismes

Les aliments fermentés sont le résultat de l'activité de quelques espèces de microorganismes parmi des milliers d'espèces de bactéries, de levures et de moisissures. Le type de flore bactérienne qui se développe dans chaque aliment fermenté dépend de l'activité de l'eau, du pH, de la concentration du sel, de la température et de la composition de l'aliment. Lorsque les microorganismes qui prédominent dans une fermentation produisent de l'alcool ou de l'acide lactique ou bien de l'acide acétique, on parle respectivement de fermentation alcoolique, lactique ou acétique. Toutefois, la fermentation acétique est considérée comme un processus essentiellement oxydatif (Babacar, 2002).

Les fermentations industrielles ont à l'origine, eu pour but la production d'éthanol, d'acétone, et de butanol (Masschelein, 1979). Aujourd'hui, l'industrie chimique utilise les propriétés bactériennes pour la production d'un nombre toujours croissant de corps organiques comme les antibiotiques, les vitamines, les hormones, les polysaccharides, les enzymes, les acides, les aliments (fromages, produits laitiers, choucroutes, saucisses, boisson etc...), les produits de textiles, de tanneries et de papeteries mais aussi, pour la production de biogaz à partir de déchets d'origine animale (Masschelein, 1979 ; Kanwar et Kalia, 1993).

L'intérêt d'utiliser les microorganismes pour effectuer des transformations industrielles est lié à leur énorme activité biochimique caractérisée par des vitesses d'échange et de croissances élevées. Les microorganismes utilisent des substrats simples carbonés ou azotés pour produire de nombreux composés organiques. Ainsi, selon le type de produit que l'on désire avoir, les

microorganismes utilisés, peuvent être des bactéries lactiques, acétiques, des levures ou des moisissures. Par conséquent, on ne parle de yaourt que si le lait fermenté contient un nombre suffisant de streptocoques lactiques et de lactobacilles vivants (Jacqmain-Goldsmit et Daras-Lhoir, 1984).

De plus, la fermentation des aliments est une technique de conservation couramment employée de nos jours et qui dérive de procédés millénaires. Il s'agit d'un processus strictement anaérobie. Ce terme désigne cependant aujourd'hui dans le langage courant à la fois les processus aérobie et anaérobie de dégradation des dérivés carbonés. La fermentation garantit, d'une part, l'amélioration de la durée de vie et de la qualité microbiologique des aliments (inhibition des microorganismes contaminants), et permet, d'autre part, d'en améliorer les propriétés nutritionnelles (meilleure digestibilité du lactose du lait, diminution de la toxicité des racines de manioc) et organoleptiques (flaveur, arôme, texture, apparence...) Aurélie (2003).

De nombreuses classifications des fermentations alimentaires ont été établies suivant des critères différents. Steinkraus (1997) distingue sept classes de fermentations alimentaires :

1. les fermentations à base de protéines végétales provenant de mélanges de végétaux et utilisées comme des substituts de viandes (ex : tempeh et oncom) ;
2. les sauces et les pâtes fermentées salées, riches en acides aminés et en peptides (ex : sauce au soja, miso) ;
3. les fermentations lactiques de végétaux (« pickle », choucroute, olive), de laits (yaourt, fromages), de mélanges à base de poissons (idli), ou de viandes (saucisses fermentées) ;
4. les fermentations alcooliques produisant les vins, les bières, les alcools asiatiques (alcool de riz), les alcools à base de sucre de canne (rhum) ;
5. les fermentations acétiques produisant les cidres et différents vinaigres (vinaigre de vin, vinaigre de coco, vinaigre de palmier...) ;
6. les fermentations alcalines (dawa-dawa, ou le natto) ;
7. les fermentations à base de levains de panification.

3-3 Différents types de fermentation du vin de palme

La microflore contenue dans les substrats est à l'origine de la modification de la composition chimique de ces substances. Ces modifications ont été souvent toutes désignées par

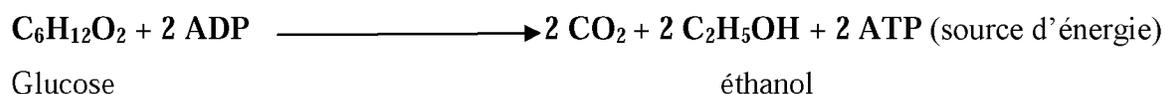
le terme de fermentation. Suivant la nature des produits formés à partir des glucides, on distingue plusieurs types de fermentations dont la fermentation alcoolique, lactique et acétique.

3-3-1 Fermentation alcoolique

Un troisième principe qui en général contribue à la sécurisation des aliments et des boissons est la fermentation impliquant la production d'éthanol (Steinkraus, 1979). Il s'agit notamment des vins, des bières, du lao-chao chinois, du kaffir de l'Afrique du sud, la bière de sorgho et le pulque mexicain. Ce sont généralement des fermentations provoquées par des levures mais impliquent des moisissures telles que les *Amylomyces roxii* et les *Endomycopsis* et parfois des bactéries lactiques comme *Zymomonas mobilis*. Les substrats comprennent du miel, du jus de canne à sucre, la sève de palmier à huile, du jus de fruit, des grains de céréales germés ou d'amidon hydrolysé qui contiennent tous des sucres fermentescibles qui sont rapidement transformés en éthanol par des levures de l'environnement avec production de dioxyde de carbone (CO₂). Les quantités de CO₂ produites permettent de maintenir la fermentation en anaérobie. Les levures se multiplient rapidement dans l'aliment et les bactéries dont la plupart sont aérobie ne peuvent pas les concurrencer. L'éthanol produit empêche la croissance des germes pathogènes et, tant que le produit fermenté reste anaérobie, le produit est raisonnablement stable et préservé. Avec les substrats riches en amidon tels que les grains de céréales, il est nécessaire de convertir une partie de l'amidon en sucres fermentescibles. Cela se fait de diverses manières, c'est-à-dire broyer les grains pour introduire le ptyaline (Régions des Andes en Amérique du sud où le maïs est un aliment de base) ou la germination (maltage) de l'orge ou des grains eux-mêmes dans la plupart du monde où les bières sont produites. Dans certaines parties de l'Afrique, une jeune femme ne peut pas se marier tant qu'elle n'est capable de faire de la bière bantou à son mari (Steinkraus, 2002).

En Asie, il existe deux méthodes de transformation du riz en aliment alcoolisé. La première consiste à l'utilisation d'une moisissure telle que l'*Amylomyces rouxii* qui produit les amylases permettant de convertir l'amidon en sucres et une levure l'*Endomycopsis fibuliger* qui réduit le glucose/maltose en éthanol. Le goût aigre ou alcoolique produit de la fermentation du riz est appelé *ketan ruban* en Indonésie. Il est consommé comme un dessert. Lorsque le manioc est utilisé comme substrat, le produit est appelé *ketella bande* (Merican et Yeoh, 1989; Steinkraus, 1983a). Ce procédé peut également être utilisé pour produire du vin à partir de riz, du lao-chao chinois et de tapuy en Malaisie.

La deuxième méthode est le koji japonais utilisé pour la fermentation du riz pour la production de vin de riz (saké) (Yoshizawa et Ishikawa 1989). Dans ce processus, le riz bouilli est envahi par une moisissure amylolytique telle qu'*Aspergillus oryzae* pendant environ 3 jours à 30°C. La moule recouverte de riz appelée "koji" est ensuite inoculée avec une culture de levure *Saccharomyces cerevisiae* et l'on ajoute de l'eau. La saccharification par les amylases dans la moule et la fermentation alcoolique par les levures se déroulent simultanément. Le résultat de la fermentation lente est constitué des charges élevées de levures et le taux d'éthanol pouvant atteindre 23%. Les matières pouvant servir de base à la transformation alcoolique sont nombreuses et variées. Les levures transforment les sucres en alcool avec dégagement de gaz carbonique (produits principaux) et en plusieurs autres produits bien que présents en faible quantité (Scriban, 1988). Ce principe est à la base de la production de vin à partir des fruits sucrés. La réaction à lieu selon l'équation de Gay Lusac



3-3-2 Fermentation lactique

La fermentation lactique peut être définie comme un procédé de fermentation dans lequel interviennent un groupe de bactéries gram positive, non-sporulantes, immobiles, catalase négative, qui croissent dans des conditions anaérobies et utilisent les sources de carbones pour produire de l'acide lactique comme seul ou majeur acide organique. En Afrique de l'Ouest, la fermentation lactique a été traditionnellement développée pour une large gamme de matières premières essentiellement constituées d'amidon (plus de 80% de matière sèches) (Yao et *al.*, 2009). Ces aliments et boissons fermentés, très populaires, contribuent à l'alimentation des populations et sont produits à l'échelle locale dans les foyers, les villages et par de petites unités de production (coopératives de femmes). Des bactéries lactiques, des levures et moisissures ont été identifiées comme les principaux microorganismes se développant au cours de la fermentation. Dans nombre de cas, au départ, après lavage de la matière première les bactéries lactiques sont peu nombreuses. Elles appartiennent essentiellement aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* (Beuchat, 1995). L'action des bactéries lactiques au cours de la fermentation a été associée tout d'abord à l'élaboration de l'arôme et de la texture du produit final, mais également à l'obtention d'un produit sain grâce aux acides organiques

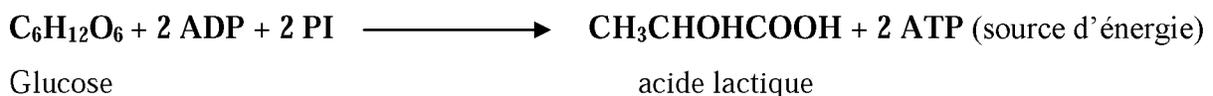
produits. D'autres actions, et non des moindres, sont souvent rapportées. Par exemple, les propriétés probiotiques des bactéries lactiques et l'inhibition des bactéries pathogènes sont particulièrement importantes, dès lors qu'il a été signalé que les aliments fermentés contribuaient à réduire la durée et la sévérité des diarrhées infantiles (Mensah et *al.*, 1990; Kimmons et *al.*, 1999).

Le problème majeur de l'ensemble de ces procédés traditionnels se situe au niveau de la qualité des différents aliments obtenus qui est très fluctuante. En effet, le processus fermentaire qui s'effectue spontanément grâce au développement de la microflore épiphyte, peut conduire à des produits d'une qualité organoleptique, microbiologique ou toxicologique indésirable. Pour pallier ce problème, des études sont de plus en plus consacrées à l'isolement et à l'identification, au cours de la fermentation, de bactéries lactiques se caractérisant par des propriétés physiologiques et métaboliques particulières en vue de leur utilisation comme des cultures starters (Olasupo et *al.*, 1996 ; Agati et *al.*, 1998 ; Sanni et *al.*, 2002 ; Kostinek et *al.*, 2005 ; Oguntoyinbo, 2007).

Les dernières cultures starters se définissent comme des préparations microbiennes concentrées, d'au moins un micro-organisme, qui permettent de réaliser un meilleur contrôle de la fermentation ainsi qu'une standardisation du procédé de fabrication (Holzapfel, 2002). Le but visé à terme est de fournir au consommateur un produit sain, de qualité organoleptique constante et acceptable.

Les bactéries intervenant dans la fermentation lactique sont les genres *Streptococcus*, *Pediococcus* et les espèces du genre *Lactobacillus*: *Lactobacillus leichmanii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*.

Lorsque la fermentation est hétérolactique, la voie employée est celle des pentoses phosphates et aboutit à la production de lactate, d'éthanol et éventuellement d'acétate. Cette fermentation est réalisée par les genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus* (Bouix et Leveau, 1993). La production d'acide lactique se fait par la voie homolactique selon l'équation suivante :



3-3-3 Fermentation acétique

Si les produits de la fermentation alcoolique ne sont pas tenus en anaérobiose, les bactéries lactiques des genres *Gluconobacter* et *Acetobacter* présents dans l'environnement et permettent

d'oxyder l'éthanol en acide acétique (Conner et Allgier, 1976; Steinkraus et *al.*, 1996). Cette fermentation est à la base de la production du vinaigre. Par ailleurs, le genre *Bifidobacterium* dont la plupart des espèces produisent plus d'acide acétique que d'acide lactique intervient dans ce type de fermentation (Bouix et Leveau, 1993). Les fermentations impliquant un taux élevé d'acide acétique sont sans danger pour les aliments. L'acide acétique est également bactériostatique et bactéricides en fonction de la concentration. Dans la plupart des cas, les vins de palme et des bières kaffir contiennent non seulement de l'éthanol mais aussi de l'acide acétique. L'acide acétique étant encore plus conservateur que l'éthanol. Le vinaigre est un produit très apprécié, utilisé dans le décapage et la conservation des concombres et autres légumes. Les fermentations alcooliques et acétiques sont utilisées pour assurer la conservation de plusieurs aliments. Au cours de ces dernières années, le public Américain a fait connaissance avec une boisson fermentée appelée *kombucha* ou thé champignon (Steinkraus, 2002).

En effet, *kombucha* a été connue et produite pendant longtemps en Chine, en Russie et en Allemagne (Greenwalt et *al.*, 1998; 2000). Sa fermentation consiste à une infusion de thé sucré (5 à 15% de sucre) et un tapis microbien contenant *Acetobacter* et d'une variété de levures qui se développe à la surface du substrat produisant principalement des acides acétique et gluconique en quantités approximativement égales (sup à 3% du total). Le pH est d'environ 2,5 alors que diverses qualités favorables pour la santé ont été attribuées au *kombucha*. L'acide acétique est l'un des meilleurs inhibiteurs microbiens mais consommé en grande quantité peut entraîner la mort. La réaction a lieu selon l'équation :



4- Microorganismes majoritaires dans le vin de palme

4-1 Les levures

4-1-1 Définition

Les levures sont des champions unicellulaires pour tout ou partie de leur cycle végétatif et se reproduisent par bourgeonnement ou fission (Bouix et Leveau, 1993 ; Kurtzman et Fell, 1998). Leur rôle dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence par les travaux de Pasteur dans

les années 1866-1876. Depuis, leur facilité de culture et l'innocuité d'un grand nombre d'espèces en ont fait les microorganismes les plus utilisés, pour la production de boissons alcoolisées et de produits de boulangerie, mais aussi comme source de protéine, de vitamines en alimentation humaine et animale et pour la production de protéines animales et humaines (Bouix et Leveau, 1993). Elles demeurent par ailleurs des agents d'altération des produits alimentaires si leur développement n'est pas maîtrisé.

4-1-2 Morphologie et cytologie

Les cellules végétatives des levures peuvent être sphériques, ovoïdes, allongées, en ellipse, apiculées (citron), en forme de bouteille, triangulaires. Quelques fois la forme est caractéristique d'un genre. Par exemple, les cellules en forme de bouteille appartiennent au genre *Malassezia*, ou la forme triangulaire au genre *Trigonopsis*. Mais le plus souvent la forme et la taille des cellules des souches d'une même espèce sont sujettes à variation (Bouix et Leveau, 1993). La taille cellulaire varie de 2-3 μm à 20-50 μm de long. La largeur est moins variable et se situe entre 1 et 10 μm .

La paroi des levures a une épaisseur de 150 à 230 nm. Par sa rigidité, elle confère à la cellule une forme caractéristique. Elle est composée de polysaccharides (80 %), protéines (10-20 %), lipides (7-10 %), sels minéraux (5 %) (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990).

Les levures ont une structure typique d'eucaryote. Leurs particularités sont :

- les mitochondries au nombre de 30 à 50 sont réprimées en présence de fortes concentrations de glucose ;
- le nombre de vacuoles et leur taille est fonction de l'âge des cellules ;
- le plasmide 2 μm est un élément extra-chromosomique présent dans presque toutes les souches de *S. cerevisiae* (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990).

4-1-3 Classification

Les levures appartiennent à trois classes :

- les ascomycètes : ces levures se reproduisent par un processus sexué dans un asque qui résulte de la transformation d'une cellule après méiose ;
- les basidiomycètes : ces levures présentent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.

- les deutéromycètes : cette classe regroupe l'ensemble des levures ne présentant pas de mode connu de reproduction sexée (Bouix et Larpent, 1993).

A l'intérieur de ces classes, les levures sont regroupées en ordre, famille, sous-famille éventuellement, genre et espèce (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification des levures (Kreger Van Rij, 1984)

Classes	Familles	Genres
Ascomycètes	Spermophthoraceae	Coccidiascus, Metschnikowia, Nematospora
	Saccharomycetaceae	<i>Schizosaccharomyces, Hanseniaspora, Nadsonia, Saccharomycodes, Wickerhamia, Lipomyces, Clavispora, Ambrosiozyma, Arthroascus, Citeromyces, Cyniclomyces, Debaryomyces, Dekkera, Guilliermondella, Hansenula, Issatchenkia, Kluyveromyces, Lodderomyces, Pachysolen, Pachyticospora, Pichia, Saccharomyces, saccharomycopsis, Schwaniomyces, Sporopachydermia, Stephanoascus, Torulaspora, Wickerhamiella, Wingea, Zygosaccharomyces</i>
Basidiomycètes	Filobasidiaceae	<i>Chionosphaera, Filobasidiella, Filobasidium</i>
	Levures formant des teliospores	<i>Leucosporidium, Rhodosporidium, Sporidiobolus</i>
	Sirobasidiaceae	<i>Fibulobasidium, Sirobasidium</i>
	Tremellaceae	<i>Holtermannia, Tremella</i>
Deuteromycètes	Cryptococcaceae	<i>Aciculoconidium, Brettanomyces, Candida, Cryptococcus, Kloeckera, Malassezia, Oosporidium, Phaffia, Rhodotorula, Sarcinosporon, Schizoblastosporion, Sterigmatomyces, Sympodiomyces, Trichosporon, Trigonopsis</i>
	Sporobolomycetaceae	<i>Bullera, Sporobolomyces</i>

4-1-4 Méthodes d'identifications des levures

4-1-4-1 Méthodes classiques ou conventionnelles

L'identification classique des levures est basée sur les caractéristiques de la reproduction végétative, les caractéristiques sexuelles et les caractéristiques biochimiques et physiologiques (Bouix et Leveau, 1993 ; Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2003).

Les caractéristiques de la reproduction végétative concernent le mode de reproduction végétative, la taille des colonies, leur forme (contours nets ou irréguliers, convexe ou concaves), leur aspect (mat ou brillant), leur pigmentation, la formation de mycélium, de chlamydiospores et de ballistospores (Bouix et Leveau, 1993).

L'étude de la sporulation permet de déterminer les caractéristiques sexuelles des levures. Toutes les levures n'ayant pas les mêmes exigences, plusieurs milieux de sporulation doivent être utilisés simultanément.

Etudier les caractères biochimiques et physiologiques des levures revient à étudier la fermentation des sucres, l'assimilation des composés carbonés, l'assimilation des composés azotés, les besoins en vitamines de croissance, la résistance au cycloheximide (actidione), la croissance sur milieu à haute pression osmotique, la production d'acide acétique, la recherche de l'uréase, la croissance à différentes températures, la croissance en présence de 1 % d'acide acétique, la réaction au bleu de diazonium B (Kurtzman et *al.*, 2003). Certains de ces tests sont regroupés sur des galeries (galeries API C).

Les caractères morphologiques et sexuels permettent de déterminer l'espèce dans chaque genre (Bouix et Leveau, 1993).

4-1-4-2 Méthodes moléculaires

Bien que les méthodes conventionnelles soient toujours employées dans l'identification et la classification des levures, elles conduisent souvent à des erreurs. Les raisons possibles des limites de ces méthodes sont la variation de la morphologie des levures, la distinction entre deux genres souvent sur seulement une ou deux caractéristiques physiologiques, la réversibilité de plusieurs caractères physiologiques par mutation d'un seul gène (Rainieri et *al.*, 2003). Une grande expérience est donc requise pour interpréter efficacement les résultats des méthodes conventionnelles (Vaughan-Martini, 2003). Ces limites ont conduit au développement des méthodes moléculaires.

Plusieurs techniques ont donc été développées pour discriminer et/ou identifier les microorganismes par analyse de l'ADN ou d'une partie de celui-ci. L'hybridation ADN/ADN permet de comparer l'ADN génomique d'une espèce inconnue avec celui d'une espèce connue. L'électrophorèse en champ pulsé permet de comparer les caryotypes des levures (Frezier et Dubourdieu, 1992 ; Querol et *al.*, 1992). Mais, beaucoup de méthodes dérivent aujourd'hui de la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase chain reaction ou PCR) développée par Saiki et *al.*, (1985). La matrice d'ADN bicaténaire est dénaturée à la chaleur, puis des amorces nucléotidiques qui délimitent la portion d'ADN à amplifier sont hybridées. Grâce à la présence dans le mélange réactionnel d'une ADN polymérase tolérant les hautes températures et d'un mélange désoxyribonucléotides, deux nouveaux brins complémentaires sont synthétisés comme des copies de la matrice initiale. Cette étape est répétée n fois, aboutissant à 2^n copies de la portion d'ADN délimitée.

Sur cette base, de nombreuses applications ont vu le jour. Des PCR spécifiques d'espèces ont été mises au point par Pearson et McKee, (1992). L'amplification des introns en utilisant des amorces complémentaires aux sites d'épissage a été utilisée pour différencier les espèces de levures (De Barros Lopes et *al.*, 1996 et 1998). La Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) a été développée par Williams et *al.* (1990), puis adaptée par différents auteurs pour différencier les souches de levures (Baleiras Couto et *al.*, 1994, 1995 ; Molnar et *al.*, 1995 ; Quesada et Cenis, 1995). Cette technique utilise l'existence de courtes répétitions de séquences nucléotidiques dispersées sur le génome des microorganismes. Une seule amorce est utilisée et la taille de l'élongation est aléatoire. D'autres techniques permettant de réaliser un profil génétique ont été mises au point telles que l'Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Cette technique est basée sur l'amplification spécifique par PCR de fragments de restrictions issus de la digestion de l'ADN génomique (Vos et *al.*, 1995).

Dans la même idée, une PCR a été mise au point pour discriminer les souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Elle est basée sur l'amplification des régions comprises entre les éléments delta des transposons de levures Ty1 (Ness et *al.*, 1993 ; Masneuf et Dubourdieu, 1994 ; Legras et Karst, 2003). Les éléments delta, décrite par Cameron et *al.* (1979), sont présents à chaque extrémité des transposons Ty1 et parfois disséminées dans le génome de la levure comme unité simple ou multiple. Il en existerait au moins une centaine de copies. Certaines portions du génome ont une forte densité d'unités delta. Ce sont ces régions qui seront amplifiées dans le cas de la discrimination de souches.

La discrimination des souches de *Saccharomyces cerevisiae* peut également être réalisée par caryotypage. Les souches sont différenciées par le nombre, la taille et l'intensité des bandes obtenues, donc par leur profil chromosomique (vezinhet et *al.*, 1990 ; Yamamoto et *al.*, 1991).

De même, la découverte de courtes séquences, de deux à quatre nucléotides, répétées dans le génome (short sequence repeat ou microsatellites) a été utilisée pour discriminer les souches de *Saccharomyces cerevisiae* (Baleiras Couto et *al.*, 1996 ; Gallego et *al.*, 1998). L'amplification est réalisée en utilisant une seule amorce dont la séquence est souvent le microsatellite répété *n* fois. Un profil génétique plus ou moins spécifique des souches est obtenu à l'issue de l'amplification. La PCR-Restriction Fragment Length polymorphism (RFLP) a également été développée par Botstein et *al.* (1980). Cette technique permet d'amplifier une région de taille variable chez différentes espèces et de digérer l'amplicon obtenu par différentes enzymes de restriction. En se référant aux tailles des fragments obtenus, on peut identifier un grand nombre d'espèces de levures (Constanti et *al.*, 1998 ; Esteve-Zarzoso et *al.*, 1999 ; Granchi et *al.*, 1999 ; Pramateftaki et *al.*, 2002).

D'autres techniques plus récentes telles que la Thermal Gradient Gel Electrophoresis (TGGE), la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), la PCR en temps réel ont été mises au point. Parmi les méthodes récemment utilisées pour l'identification des levures du vin, l'une des méthodes prédominantes est l'analyse par PCR-RFLP de la région ITS-5.8S rDNA (Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2003).

4-1-4-2-1 Analyse par PCR-RFLP de la région ITS-5.8S rDNA

C'est une technique qui consiste à amplifier par PCR la région ITS-5.8S de l'ADN ribosomique (ADNr ou rDNA) suivie de la digestion des fragments amplifiés par des enzymes de restrictions.

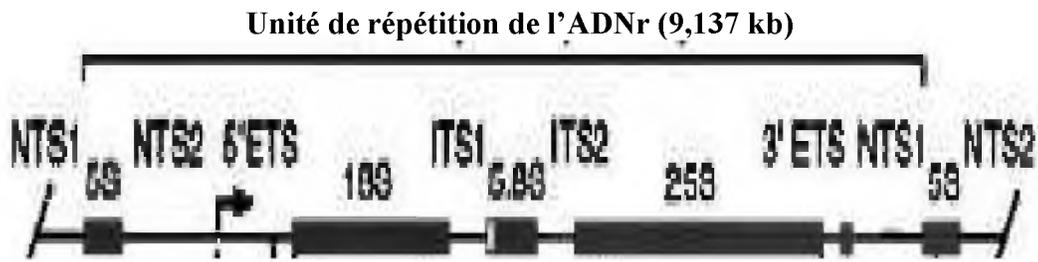
L'ADNr est une région d'environ 1 à 2 Mégabases consistant en une répétition de 100 à 200 copies d'une séquence de 9,137 Kilobases. Cette région est située sur le bras droit du chromosome XII chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Chaque unité de répétition contient les gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARNr) 5S, 5.8S, 25-28S et 18S ainsi que trois types de régions qui séparent les gènes. Ces régions sont nommées internal transcribed spacers (ITS1 et ITS2), external transcribed spacers (ETS1 et ETS2) et nontranscribed spacers (NTS1 et NTS2) (figure 1a).

L'ADNr codant pour les ARNr est la première cible moléculaire dans les études écologiques. En effet, ces ARNr sont présents chez tous les microorganismes et ont la particularité de posséder des régions très conservées entre les espèces et des régions hypervariables (Gutell et *al.*, 1994 ; Van de Peer et *al.*, 1996). Les parties hautement conservées (gènes codant les ARNr 5S, 18S, 5.8S, 28S) permettent l'identification des grands groupes de microorganismes (eucaryotes, eubactéries, archaebactéries) (Hicks et *al.*, 1992), et les parties hypervariables (domaine D1/D2) l'identification des espèces ou même parfois de sous-espèces (Amann et *al.*, 1995). Plusieurs techniques d'identification des levures sont basées sur l'amplification de certaines régions de l'ADNr.

Les ITS (ITS1 et ITS2) sont les régions non codantes de l'ADNr comprises entre les régions 18S rRNA et 5.8S rRNA d'une part, et 5.8S rRNA et 28S rRNA d'autre part (figure 1b). la région ITS (constituée par le gène 5.8S rRNA et les ITS) décrite par White et *al.* (1990) montre un faible niveau de variabilité intraspécifique et un haut niveau de polymorphisme interspécifique (Las Heras-Vazquez et *al.*, 2003). Plusieurs amorces ont été décrites pour l'amplification de cette région (figure 1b) mais le couple d'amorces (ITS1, ITS4) est le plus couramment utilisé.

La PCR-RFLP de la région ITS est une méthode basée sur les différences de taille de cette région selon les espèces de levures. En cas d'égalité dans la taille amplifiée, la digestion enzymatique qui suit (RFLP) permet de distinguer les espèces, par leur profil de restriction sur quelques enzymes.

A



B

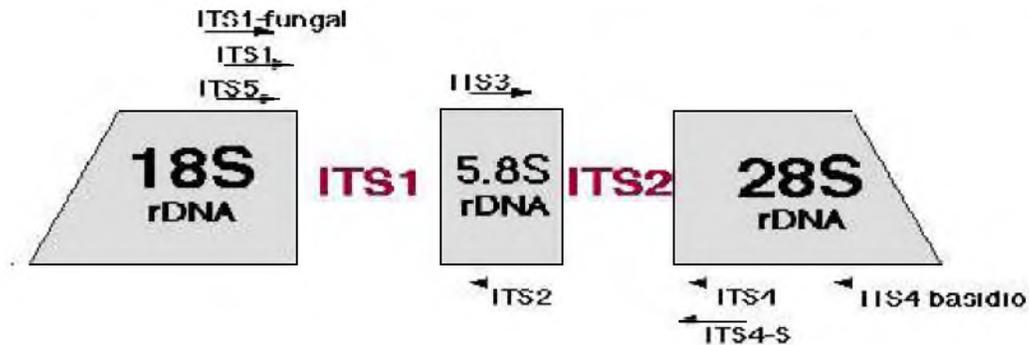


Figure 4: Schéma de l'unité de répétition de l'ADNr (A) et de la région ITS (B). ITS1 et ITS2 indiquent respectivement les espaces intergéniques 1 et 2. Les ITS avec les flèches (\leftrightarrow) indiquent la position des différentes amorces.

(sources : Divol, 2004; Vilgalys lab, Duke University, plantbio.berkeley.edu/~bruns/picts/results/its-map.GIF).

4-2 Les bactéries lactiques

4-2-1 Définition

Le terme de bactéries lactiques est intimement associé aux bactéries impliquées dans la fermentation des aliments pour l'homme. La première culture pure était des *Acterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873. Historiquement, les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* ont été les premiers à être décrits. D'un point de vue technologique, les genres cités ci-après sont considérés comme les principaux types de bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Etragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella* (Axelsson, 2004 ; Guiraud, 2003 ; Limsowtin et al., 2004 ; Klein et al., 1998).

De plus, les bactéries lactiques sont définies comme des bactéries qui fermentent le glucose pour produire surtout l'acide lactique. Cependant cette définition couvre plus de taxa que ceux désignés par les bactéries lactiques. C'est surtout leur importance dans la fermentation des aliments et produits alimentaires (viandes, végétaux, fruits, poissons, produits laitiers et ensilage) qui les détermine (Vandamme et *al.*, 1996). Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme appartenant aux bactéries lactiques du fait de son effet probiotique sur l'organisme et son utilisation dans les aliments (Patrignani et *al.*, 2006).

4-2-2 Caractéristiques morphologiques et biochimiques

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique. Ce sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. A quelques exceptions près, les bactéries lactiques sont des coques ou bâtonnets Gram positif, généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotoles, et ne possédant pas de catalase (certaines souches possèdent une pseudocatalase), de nitrate réductase, et de cytochrome oxydase mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène. Elles ont des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (Holzapfel et *al.*, 2001 ; Gevers 2002). Il existe d'autres bactéries produisant de l'acide lactique mais qui ne sont pas considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques. C'est le cas, par exemple, de *Bacillus* et *Sporolactobacillus* qui sont des bactéries Gram positif sporulées (Axelsson, 2004).

L'absence de catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent cette activité sur des milieux riches en hème (Bourgeois et *al.*, 1996).

Le manganèse joue un rôle important pour les bactéries lactiques en les protégeant de la toxicité de l'oxygène. Accumulé dans la cellule, cet élément est comparable au superoxyde dismutase qui décompose les superoxydes. Depuis longtemps, les composants des épices stimulent la production d'acide lactique par les cultures starters. Zaika et Kissinger (1984, cité par Hagen et *al.*, 2000) ont prouvé que le manganèse est le seul composant des épices qui ait cette propriété. Le métabolisme des bactéries lactiques dépend des quantités du manganèse présent dans le milieu de culture et le besoin en manganèse diffère d'une espèce lactique à l'autre. Dans la viande, le taux de manganèse est faible et l'addition de manganèse peut stimuler considérablement la croissance des lactobacilles durant la fermentation (Leroy et *al.*, 2004).

Les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. On les distingue en deux groupes biochimiques : les homofermentaires et les hétérofermentaires. Les homofermentaires produisent deux molécules d'acide lactique (C3) par glucose (C6) consommé. Chez les hétérofermentaires, seule une molécule d'acide lactique est produite à partir du glucose. Une autre molécule en C2 est produite (en général soit de l'éthanol soit de l'acide acétique) et une molécule d'oxygène. La différence entre ces deux groupes est détectable par le dégagement de CO₂. Beaucoup de *Lactobacillus* hétérofermentaires produisent normalement, en dehors de l'acide lactique, du formate, de l'éthanol et de l'acétate sous certaines conditions. Il ne s'agit pas d'une déviation vers la voie des pentoses mais une partie du pyruvate est transformée en acétyl CoA. En condition d'excès de nutriments, le pyruvate est converti en lactate, mais en condition de carence, une partie de pyruvate est métabolisée en éthanol et acétate. Ce mécanisme est de meilleur rendement énergétique pour la bactérie car de l'ATP est synthétisé durant la conversion du pyruvate en acétate (Bourgeois et *al.*, 1996).

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature, sur la peau, dans le système digestif, la muqueuse vaginale où elles accomplissent de nombreuses fonctions. Elles créent surtout un environnement hostile aux bactéries pathogènes. Elles survivent dans un milieu à faible activité d'eau, et résistent à l'éthanol (10-15 % éthanol) et au CO₂.

En général, les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance tels que vitamine B, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Les milieux de culture sont complexes et dits "riches". Il est donc difficile d'obtenir de bons milieux sélectifs. Seul l'abaissement du pH sera souvent utilisé comme agent de sélection. Les bactéries lactiques tolèrent en effet des pH acides (pH ≤ 5). A ces pH, et à *fortiori* pour des pH bas, beaucoup de bactéries communes ont leur croissance inhibée. Ces propriétés sont utilisées en agro alimentaire pour transformer la matière et empêcher le développement de la plupart des bactéries d'altération ou des pathogènes. Il apparaît donc que les produits fermentés puissent être considérés comme "à faible risque" vis-à-vis des pathogènes courants. Cependant, il n'est pas exclu que des souches particulières d'une espèce de bactérie indésirable puissent se développer. D'autres microorganismes sont également connus pour se développer à pH acide, comme de nombreuses levures et moisissures (Nielsen et *al.*, 2008 ; Sachindra et *al.*, 2005). La production d'acide lactique par les bactéries lactiques conduisant à un abaissement important du pH du milieu est largement utilisée en industrie agro-alimentaire. Chez certains industriels, le suivi de l'acidification est une garantie, quand la cinétique est correcte, qu'un produit est bien fait sans

développement de pathogènes. La croissance excessive des bactéries lactiques pourrait, par contre, être néfaste dans certains cas, en entraînant par exemple un mûrissement du goût du vin, de la bière, des viandes, du jus de fruit...) (Guiraud et *al.*, 2003).

4-2-3 Taxonomie et classification

Groupe hétérogène, les bactéries lactiques sont représentées par plusieurs genres d'importances d'ailleurs différentes. Les cellules sont soit en coque (*Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*) ; soit en bacille (*Lactobacillus*) (Tableau 4). Schleifer et Kilpper-Balz (1987) ont séparé par la suite le genre *Streptococcus* en plusieurs genres dont *Streptococcus* lui-même, *Lactococcus* et *Enterococcus*. A ces genres ont été ajoutés les genres *Bifidobacterium* et *Carnobacterium* (Kandler et Weiss, 1986 ; Collins et *al.*, 1987). Ces bactéries se distinguent en plus par leur type fermentaire ; les homofermentaires tandis que les *Carnobacterium*, *Bifidobacterium* et d'autres *Lactobacillus* sont hétérofermentaires.

La systématique est en évolution permanente. Il n'y a jamais eu de règles unanimement reconnues sur la façon dont deux bactéries différentes devraient être phénotypiquement classées. Par exemple, quelles caractéristiques sont importantes dans la définition des sous-espèces, des espèces et du genre ? La littérature scientifique suit généralement les recommandations des comités de taxonomie qui opèrent sous les auspices de l'Union Internationale de Sociétés Microbiologiques (Sneath, 2001).

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (Krieg, 2001). Les nouveaux outils pour l'identification et la classification des bactéries lactiques remettent couramment et/ou complètent les méthodologies traditionnelles basées sur les phénotypes. La classification s'appuie sur des données moléculaires comme la comparaison des séquences codant pour les ARN16S ribosomiques.

D'après Ludwig et *al.* (2008), le phylum *Firmicutes* comprend trois classes : *Bacilli*, *Clostridia* et *Erysipelotrichi*. Appartenant à la classe *Bacilli*, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

-Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.

-Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.

-Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Les révisions taxonomiques des bactéries lactiques montrent que ces dernières peuvent comprendre environ une quarantaine de genres.

Tableau 4 : Quelques caractéristiques de différents genres de bactéries lactiques : (a) Schleifer, 1986 ; (b) Farrow et *al.*, 1989 ; (c) Kandler et Weiss, 1986 ; (e) Collins et *al.*, 1987.

Genres	Forme des Cellules	Arrangement	Fermentation	ADN : GC%
<i>Streptococcus</i>	Coque	courte chaînette	Homofermentaire	34-46 (a)
<i>Lactococcus</i>	Coque	courte chaînette	Homofermentaire	
<i>Enterococcus</i>	Coque	courte chaînette	Homofermentaire	
<i>Pediococcus</i>	Coque	Tétrade	Homofermentaire	34-42 (a)
<i>Leuconostoc</i>	Coque	isolé, paire, chaînette	Hétérofermentaire	36-43 (b)
<i>Lactobacillus</i>	Bacille	isolé, paire, chaînette	Homofermentaire et hétérofermentaire	32-53 (c)
<i>Bifidobacterium</i>	cocobacille, bacille	paire, amas	Hétérofermentaire	55-67 (d)
<i>Carnobacterium</i>	Bacille	isolé, courte chaînette	Hétérofermentaire	33-37 (e)

GC% : Pourcentage molaire de l'ADN en base G et C.

4-2-3-1 Classification au niveau du genre

Les principaux genres de bactéries lactiques associées aux aliments sont les *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Il y a peu de corrélation entre la classification traditionnelle et la parenté phylogénétique des bactéries lactiques. Des genres morphologiquement distincts, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont phylogénétiquement entremêlés (Gevers, 2002). Historiquement, le genre *Bifidobacterium* était

aussi considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal (Klein et *al.*, 1998). Dans le manuel de Bergey publié en 1957, les *Bifidobacterium* étaient répertoriées comme étant des *Lactobacillus bifidum* (Axelsson et *al.*, 2004). Ces microorganismes, considérés souvent comme de véritables bactéries lactiques, sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de GC. Sur la base des données de séquençage de 16S et 23S de l'ADNr, les bactéries Gram positives forment deux embranchements. Un embranchement composé de bactéries Gram positives avec un pourcentage G + C inférieur à 50% (*Clostridium*) et un autre formé de bactéries ayant une teneur en G + C supérieure à 50% (Actinomycètes) (Holzapfel et *al.*, 2001 et Gevers, 2002). Les bactéries lactiques typiques ont une teneur en G + C inférieure à 50% alors que le genre *Bifidobacterium* qui, d'un point de vue physiologique, fait partie des bactéries lactiques, appartient à la branche des Actinomycètes qui comprend aussi *Propionibacterium* et *Brevibacterium* (Vandamme et *al.*, 1996).

L'ancien genre *Streptococcus* était divisé au début en trois groupes : *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus sensu stricto*. Mais aujourd'hui, certaines bactéries lactiques qui étaient mobiles, ressemblant aux *Lactococcus*, ont formé un autre genre séparé : les *Vagococcus*. Les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont globalement restés inchangés, mais quelques bactéries lactiques, auparavant incluses dans le genre *Lactobacillus*, forment maintenant le genre *Carnobacterium* qui regroupe des lactobacilles atypiques isolés de différents produits carnés. De plus, des souches de l'ancienne espèce *Pediococcus halophilus* ont été incluses dans le genre *Tetragenococcus* du fait de leur insensibilité à la Vancomycine. Un autre groupe de *Lactobacillus* ou *Leuconostoc* a formé un nouveau genre, les *Weissella*, en raison de leurs différences phylogénétiques avec les autres lactobacilles hétérofermentaires. Les *Leuconostoc oenos*, les « *Leuconostoc* du vin », ont formé le genre *Oenococcus*. Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec le groupe des bactéries lactiques (Axelsson, 2004).

Les caractéristiques phénotypiques ont généralement servi de point de départ pour plusieurs tests sophistiqués. La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour

décrire et classer les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins et al., 1993). En outre, la division cellulaire en deux directions perpendiculaires sur un seul plan (autrefois décrite incorrectement comme « divisée en deux plans »), est utilisée comme la caractéristique clé dans la différenciation des coques. Les genres formant les tétrades sont les *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus* (Simpson et al., 1995).

Une autre caractéristique importante utilisée dans la différenciation des genres de bactéries lactiques est le type fermentaire du glucose dans des conditions standardisées, c'est-à-dire avec des concentrations non limitées du glucose et de facteurs de croissance (acides aminés, vitamines et les précurseurs d'acide nucléique), et une disponibilité limitée en oxygène limitée. Sous ces conditions, les bactéries lactiques se divisent en deux groupes : homofermentaire et hétérofermentaire. Dans la pratique, le test de production de gaz à partir du glucose permettra de discriminer les groupes. Les *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et un sous-groupe de *Lactobacillus* sont hétérofermentaires ; toutes les autres bactéries lactiques sont homofermentaires.

La croissance à différentes températures est principalement utilisée pour distinguer les coques entre eux. Les *Enterococcus* classiques croissent entre 10°C et 45°C, les *Lactococcus* et *Vagococcus* à 10°C mais pas à 45°C. En général, les *Streptococcus* ne se développent pas à 10°C. Leur croissance à 45°C dépend de l'espèce. La tolérance au sel peut également être utilisée pour différencier les *Enterococcus*, *Lactococcus/Vagococcus* et *Streptococcus*. Seul le genre *Tetragenococcus* tolère 18 % en NaCl. La tolérance aux conditions acides et/ou alcalines peut également être utilisée. Les *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* peuvent se développer à des pH plus élevés que les autres bactéries lactiques. L'analyse de la composition en acides gras peut discriminer le genre *Vagococcus* avec les *Lactococcus*, *Vagococcus* et *Carnobacterium*. Les *Pediococcus* peuvent être confondus avec les *Aerococcus* à cause de leur similarité morphologique. Toutefois, les *Pediococcus*, plus aérotolérants que les *Aerococcus*, et poussant bien en anaérobiose, sont en opposition avec la nature microaérophile des *Aerococcus*. Les caractéristiques des bactéries lactiques sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Quelques caractéristiques de bactéries lactiques (Axelsson, 2004 ; Ho Thi Nguyet Thu, 2008)

Caractéristiques	Bacilles						Coques					
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Formation des tétrades	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Production de gaz ^b	-c	±	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Croissance à 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	-	+	+	+
Croissance à 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-	-	-
Croissance dans 6.5 % NaCl	ND ^d	±	+	+	-	±	±	-	+	+	±	±
Croissance dans 18 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	-	±	±
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Acide lactique	L	D, L, DLe	L	L	L	D	L, DLe	L	L	L	D, DLe	

+ : positif ; - : négatif ; ± : réponse variable selon les espèces ; ND : non déterminé.

a : *Weissella* peuvent être également sous forme de bacille.

b : Type de fermentation du glucose : homofermentaire (-) ou hétérofermentaire (+).

c : Faible quantité de CO₂ produite selon le milieu.

d : Peuvent ne pas se développer dans 8 % NaCl.

e : Production d'acide lactique D, L, ou DL acide variable selon les espèces

4-2-4 Utilisation industrielle des bactéries lactiques

La fermentation lactique des aliments constitue l'une des plus anciennes formes de conservation de la nourriture. Les bactéries lactiques sont utilisées empiriquement depuis des siècles dans la fabrication de nombreux aliments fermentés comme les produits laitiers (yaourts et fromages). Ces bactéries interviennent également dans la fabrication des salaisons, du vin, dans les ensilages (Tableau 6). Les bactéries lactiques utilisées en alimentation sont considérées comme non pathogènes et se voient attribuer la qualification anglo-saxon d'organisme GRAS (Generally Regarded As Safe) (Aguirre et Collins, 1993 ; Adams et *al.*, 1995 ; Caplice et Fitzgerald, 1999). Leur action sur la conservation d'un aliment est liée à l'abaissement du pH consécutif à la production d'acide lactique. Les bactéries lactiques peuvent aussi produire de nombreux agents antibactériens tels que les bactériocines (Moll et *al.*, 1999 ; Naidu et *al.*, 1999) qui contribuent à inhiber la croissance de la flore indésirable. Enfin, elles ont une action déterminante sur les qualités organoleptiques des produits fermentés. Pour toutes ces raisons, elles sont utilisées industriellement comme des ferments pour la production des aliments (Hammes et *al.*, 1990 ; Hammes et Hertel, 1998).

Tableau 6 : Bactéries lactiques utilisées dans la fermentation de certains aliments (Amoa-Awua et *al.*, 1996 ; Drouault et Gorthier, 2001 ; Blandino et *al.*, 2003 ; Yousif et *al.*, 2005 ; Assanvo et *al.*, 2006).

Aliments/produits	Substrats	Bactéries lactiques
Produits laitiers		
Fromages	Lait de vache, chèvre ou brebis	<i>Lactocoques, Lactobacilles, Streptococcus, Enterococcus</i>
Yaourt	Lait de vache	<i>S. salivarius subsp. Delbrueckii</i>
Lait fermenté	Lait de vache	<i>L. acidophilus et Bifidobacterium</i>
Kéfir	Lait de vache, de jument ou de chèvre	<i>L. kefir</i>
Produits carnés et produits de la pêche		
Saucisse semi-sèche	Porc, bœuf	<i>Pediococcus, L. plantarum, L. brevis</i>
Jambon sec	Porc	<i>Pediocoques</i>
Izushi	Poisson, riz, légumes	<i>Ln. Mesenteroides</i>
Produits végétaux		
Ogi	Maïs, sorgho, mil	<i>L. plantarum, L. lactis</i>
Olives	Olives vertes	<i>Pediocoques, L. plantarum, L. brevis, Ln. mesenteroides</i>
Gari	Manioc	<i>L. plantarum, L. fermentum, L. brevis, Ln. fallax</i>
Attiéké	Manioc	<i>L. salivarius, L. delbrueckii</i>
Agbelima	Manioc	<i>L. plantarum, L. brevis</i>
Gowé	Sorgho	<i>L. fermentum, L. mucosae</i>
Kisra		<i>P. pentosaceus, L. confusus</i>
Hussuwa		<i>L. brevis, E. faecium</i>
Pickles	Concombres	<i>Pediocoques, L. plantarum</i>
Choucroute	Chou	<i>Ln. Mesenteroides, L plantarum</i>
Sauce soja	Soja	<i>L. bulgaricus subsp. Delbrueckii</i>
Vin	Raisin	<i>Ln. Oenos</i>
Sake	Riz	
Boissons traditionnelles		
Chibuku	Sorgho	<i>L. plantarum, L. delbrueckii, Ln. Mesenteroides</i>
Pito et Burukutu	Sorgho, Maïs	<i>L.plantarum, L. brevis</i>

4-2-5 Importance des bactéries lactiques chez l'homme et dans l'alimentation

Depuis des siècles, les bactéries sont utiles à l'homme. Elles font partie non seulement de la flore commensale de l'homme mais jouent également un rôle primordial dans la conservation, des qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments. Elles ont, en effet, des propriétés inhibitrices intéressantes liées aux différents mécanismes qui leur permettent de préserver les aliments contre la flore indésirable et donc augmenter leur durée de vie. Elles permettent aussi de protéger et d'exercer un effet bénéfique sur l'organisme (Cenatiempo et *al.*, 1996 ; Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Karaoğlu et *al.*, 2003 ; Isolauri et *al.*, 2004). Ces propriétés concernent la production d'acide organique, principalement l'acide lactique, la production de peroxyde d'hydrogène, de bactériocines et d'arômes (figure 5)

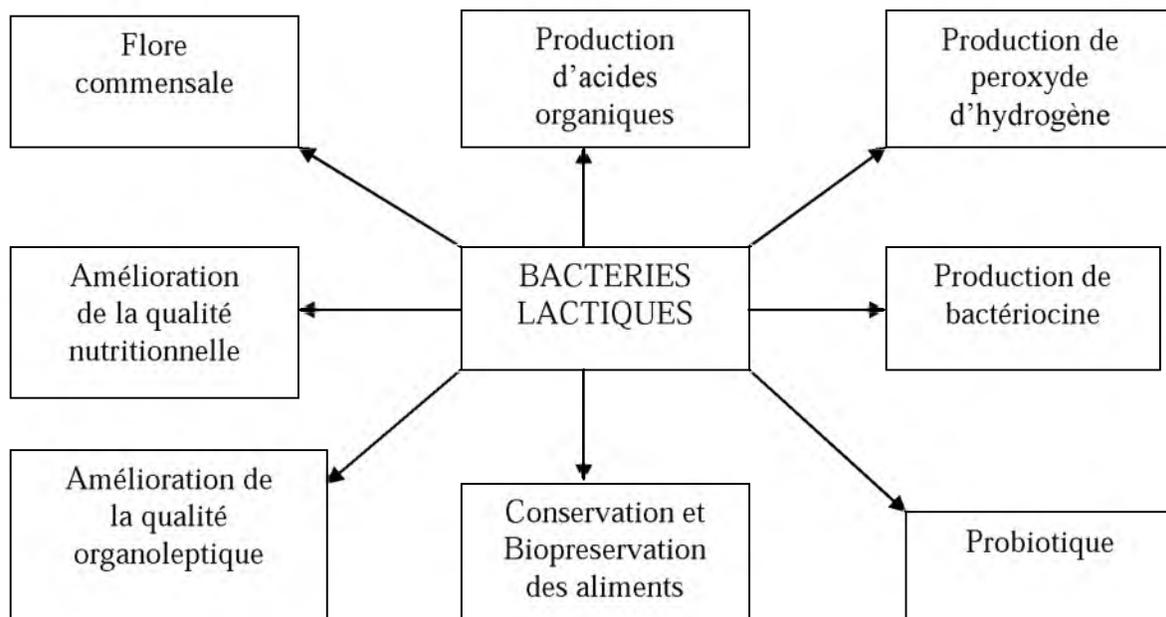


Figure 5 : Importance des bactéries lactiques

4-2-5-1 La flore commensale des bactéries lactiques

La microflore intestinale constitue un écosystème extrêmement complexe où plusieurs microorganismes cohabitent normalement dans le tractus gastro-intestinal assurant plusieurs fonctions au niveau de la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire de l'hôte (Isolauri et *al.*, 2002). Les premières bactéries à coloniser le tube digestif de l'homme dès la naissance sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives (*Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., et *Lactobacillus* spp.). Par la suite, les anaérobies strictes (*Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp.,

Clostridium spp.) constitueront la microflore dominante (Isolauri et *al.*, 2004 ; Servin, 2004). La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de 10^{11} - 10^{12} cellules microbiennes représentant 300 à 500 espèces et sous-espèces. Cette microflore représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain (Moore et Holdeman, 1974 ; Guarner et Malagelada, 2003). La microflore diffère qualitativement et quantitativement dans les différents compartiments composant le tractus gastro-intestinal (Isolauri et *al.*, 2004 ; Servin, 2004).

Les *bifidobactéries* et les *Lactobacilli* ainsi que certains *Entérocoques*, *Streptocoques* et *Bacteroides*, se distinguent par leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte comme l'amélioration de la maturation et de l'intégrité de l'intestin, l'antagonisme contre les pathogènes et la modulation de la fonction immunitaire (Gibson et Roberfroid, 1995 ; Schiffrin et Blum, 2002 ; Rastall, 2004). Les principaux rôles de la flore digestive portent sur des aspects métaboliques, trophiques et immunitaires (Guarner et *al.*, 2003). Ces bactéries métabolisent les nutriments composant les effluents déversés dans le côlon. Elles digèrent aussi certain nombre de constituants alimentaires non digérés dans la partie haute du tractus gastroentérique. Les sucres simples et complexes sont dégradés par fermentation bactérienne libérant de l'acide lactique et des acides gras à chaîne courte (butyrate, propionate, acétate) (Guarner et *al.*, 2003 ; Macfarlane et *al.*, 2003). Ces acides gras à chaîne courte (AGCC) sont acheminés par transport actif et passif à l'intérieur des cellules épithéliales où ils constituent une importante source d'énergie pour la cellule et permettent aussi d'améliorer l'absorption des minéraux. La fermentation des sucres par les bactéries du côlon produit aussi du gaz comme l'hydrogène, le méthane et le dioxyde de carbone.

Les bactéries du tube digestif ont un rôle trophique sur l'épithélium intestinal. La différenciation du tube digestif et la prolifération des cellules épithéliales sont dépendantes de l'interaction avec la microflore. Les bactéries du tube digestif protégeraient l'hôte des infections bactériennes car elles stimuleraient le système immunitaire de l'hôte et le protégeraient des pathogènes par « l'effet barrière » (Guarner et *al.*, 2003). La fonction protectrice de la flore commensale sur les bactéries pathogènes porte sur plusieurs aspects : la compétition nutritionnelle, la compétition pour les sites d'adhésion à la muqueuse intestinale, la production de substances antimicrobiennes (bactériocines, antibiotiques), l'abaissement du pH par la production d'acides organiques et la stimulation du système immunitaire.

4-2-5-2 Inhibition de la croissance des pathogènes par production des acides organiques

La fonction principale des bactéries lactiques dans l'alimentation et sur la santé de l'homme est la production des acides organiques. La fermentation est dite homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si en plus de l'acide lactique produit, d'autres composés tels que l'acide acétique, l'éthanol et le CO₂ sont aussi présents. Les bactéries lactiques peuvent également produire de l'acide propionique et l'acide butyrique comme métabolites secondaires (Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Macfarlane et *al.*, 2003). Tous ces acides inhibent la flore indésirable et/ou pathogène pouvant contaminer les aliments fermentés.

L'effet antibactérien des acides organiques est extrêmement complexe (Presser et *al.*, 1997 ; Roe et *al.*, 1998 ; Brul et Coote, 1999 ; Lambert et Stratford, 1999). Mais en dépit de leur structure chimique très variée, ces acides semblent partager un mode d'action commun (Lambert et Stratford, 1999). En effet, l'activité antibactérienne de ces acides est principalement due à leur forme non dissociée (-COOH). Sous cette forme, les acides organiques diffusent passivement à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes pathogènes ou indésirables. Ils acidifient le cytoplasme après dissociation provoquant ainsi une diminution du pH qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules. L'inhibition de cette flore prolonge la durée de conservation des aliments fermentés.

4-2-5-3 Inhibition de la croissance des pathogènes par production de peroxyde d'hydrogène

La capacité de ces bactéries à inhiber la croissance de bactéries pathogènes par la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été beaucoup étudiée pour les *Lactobacillus* commensaux du tractus urogénital (Lepargneur et Rousseau, 2002 ; Karaoğlu et *al.*, 2003). Elle semble être une caractéristique de grande importance des *Lactobacillus* vaginaux qui protègent la muqueuse vaginale. En effet, 96 % des femmes saines ont une flore à *Lactobacillus* producteurs de peroxyde d'hydrogène contre 4 % des femmes atteintes de vaginose bactérienne (Eschenbach et *al.*, 1989). Les *Lactobacillus* ne possèdent pas d'hème et n'utilisent pas le système cytochromique pour l'oxydation terminale pendant le processus respiratoire mais une oxydase flavoprotéinique qui réduit l'oxygène en peroxyde d'hydrogène et comme elles ne possèdent pas non plus de catalase pour réduire le peroxyde d'hydrogène produit, ce dernier va s'accumuler dans le milieu.

La toxicité du peroxyde d'hydrogène est due au pouvoir oxydant de la molécule elle-même ou de ses métabolites OH^- (radical hydroxyle) et O_2 (oxygène : anion superoxyde) produits par des agents réducteurs (ions halogénures du type Cl^-) et des enzymes peroxydases qui sont présentes dans le fluide vaginal. Ces molécules peuvent agir sur les protéines (inactivation des enzymes cytoplasmiques), les lipides membranaires (augmentation de la perméabilité membranaire) et les acides nucléiques (induction de mutations de l'ADN). Les conditions pour lesquelles le peroxyde d'hydrogène est produit in vivo dans le milieu vaginal ou la pression partielle en oxygène est faible, ne sont pas encore bien connues.

4-2-5-4 Inhibition de la croissance des pathogènes par production de bactériocines

Chez les bactéries lactiques, tous les genres comportent des souches productrices de petits peptides antibactériens appelés bactériocines qui inhibent la croissance d'autres bactéries (action bactériostatique ou bactéricide). Elles présentent un spectre d'activité plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices (Cenatiempo et *al.*, 1996 ; Labioui et *al.*, 2005). Elles se distinguent des antibiotiques, qui sont des métabolites secondaires, car les bactériocines sont synthétisées par les ribosomes sous forme de précurseurs qui subissent ensuite une maturation au cours de leur transport vers le milieu extracellulaire. Pour agir contre la cellule cible, elles s'ancrent sur la paroi, forment des pores et induisent la fuite du contenu cytoplasmique. Ces bactériocines font l'objet depuis une vingtaine d'années d'un nombre croissant d'études, ainsi qu'en témoigne l'abondante littérature scientifique s'y rapportant.

Il existe une variété de bactériocines produites par les bactéries lactiques. Ces molécules diffèrent essentiellement par leurs modes d'action, leurs spectres d'action et leurs propriétés physicochimiques (Diep et Nes, 2002). Sur la base de la diversité des structures et des spectres d'action, les bactériocines ont été regroupées en quatre classes.

La classe I : regroupe les lantibiotiques. Ce sont des peptides de petites tailles (inférieures à 5 KDa), thermosensibles ayant la particularité d'avoir dans leur structure des acides aminés non habituels tel que la lanthionine, la β -méthyl-lanthionine, la dehydrobutyrine et la dehydroalanine. C'est dans cette classe que sont retrouvées les nisines A et Z de *Lactococcus lactis*, ainsi que la plantacine C de *Lactobacillus plantarum*, la lactocine S de *L. sakei*, la variacine de *Micrococcus varians*, etc., (Diep et Nes, 2002). La nisine a été reconnue comme étant sans danger pour la

santé et intégrée dans la liste des produits GRAS (Generally Recognised As Safe) (Van Reenen et *al.*, 2003).

La classe II : regroupe des bactériocines dites non antibiotiques qui sont des peptides thermosensibles et de tailles inférieures à 10 KDa. Cette classe est subdivisée en quatre sous-classes suivant la diversité de la séquence de la partie N-terminale des peptides. Plusieurs bactériocines sont retrouvées dans cette classe, dont la sakacine de *Lactobacillus sake*, la pediocine des *Pediococcus*, la curvacine de *L. curvatus*, l'intéroccine des *Enterococcus*, etc., (Cleveland et *al.*, 2001).

La classe III : regroupe des peptides de hauts poids moléculaires (supérieurs à 30 KDa) et sensibles à la chaleur (détruit à 60°C). Ces bactériocines ont des spectres d'action très limités (n'agissent que sur les souches génétiquement proches). Dans cette classe sont retrouvées : l'entrérolisine de *Enterococcus faecalis*, l'helvéticine J de *Lactobacillus helveticus*, la millericine B de *Streptococcus milleri*, la zoocine A de *S. zooepidemicus*, etc., (Diep et Nes, 2002).

La classe IV : regroupe toutes les bactériocines dont l'activité antibactérienne est affectée par l'action des lipases, des protéases ou des amylases. Cela suppose la présence de lipides, des protéines ou d'hydrates de carbone dans leur structure (Diep et Nes, 2002).

Concernant le mécanisme d'action des bactériocines, plusieurs auteurs admettent qu'il peut se résumer à la formation de pores dans la membrane cytoplasmique des bactéries cibles (Bruno et Montville, 1993 ; Brotz et *al.*, 1998). La création de ces pores conduit à un flux de plusieurs composés intracellulaires vers le milieu extérieur et à la dissipation de la force motrice protonique (Le Marrec et *al.*, 2000 ; Diep et Nes 2002). Selon Song et Richard (1997), contrairement aux antibiotiques classiques, l'activité antibactérienne des bactériocines est limitée dans le temps.

Actuellement, la seule bactériocine autorisée en tant qu'additif alimentaire en Europe est la nisine (3353 Da, 34 acides aminés) produite par *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (Directive 95/2/CE, 1995). Elle est capable d'inhiber un grand nombre de bactéries à Gram positif dont *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium botulinum* (Ross et *al.*, 2002).

4-2-5-5 Effet bénéfique des bactéries lactiques sur la santé

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du XX^{ème} siècle par Metchnikoff en 1907. De la théorie de la longévité, il proposa l'utilisation des *Lactobacillus* des yaourts pour la restauration de la microflore dans le tractus gastro-intestinal. Ces microorganismes bénéfiques à la santé de l'Homme et des animaux ont reçu le nom de « probiotiques ». La FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations) et la WHO (World Health Organization) ont établi en 2001 des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotique » dans les aliments et formulé la définition suivante : « Microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte ». Actuellement, ce sont le yaourt et ses ferments (*Streptococcus thermophilus* et *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus*) et les laits fermentés contenant des *Bifidobacterium* et *L. acidophilus* ou *L. casei* qui ont fait et qui continuent de faire l'objet de recherches approfondies (Desmazaud, 1996 ; Drouault et Gorthier, 2001 ; Soomro et al., 2002). Ces bactéries sont les composants normaux de la flore intestinale (Isolauri et al., 2004).

Leurs effets bénéfiques sur la santé portent sur plusieurs aspects du tractus intestinal :

- Effet sur le transit et sur la flore intestinale : les bactéries lactiques jouent un rôle antagoniste vis-à-vis des souches pathogènes présentes dans le transit intestinal. Souvent les laits acidifiés ou le yaourt sont utilisés pour lutter contre les diarrhées notamment chez les enfants. Il a été démontré que la consommation régulière de yaourt additionné de *L. acidophilus* La5 ou de *Bifidobacterium lactis* Bb12 induit une suppression effective de l'infection due à *Helicobacter pylori* (Wang et al., 2004).

- Effet sur la modulation du système immunitaire : différents travaux suggèrent que l'administration de la flore lactique vivante est susceptible de modifier la réponse immunitaire chez les animaux et les hommes. Cette action interviendrait en stimulant, à plusieurs niveaux, la défense antibactérienne de l'organisme. Dans les mécanismes généraux, intervient l'immunité non spécifique par phagocytose par les monocytes macrophages. De plus, l'absorption des bactéries lactiques ou des laits fermentés pourrait aussi stimuler les défenses situées au niveau du tube digestif (système lymphoïde du tractus digestif GALT, c'est-à-dire Gut Associated Lymphoid Tissue).

Par leur interaction éventuelle avec l'épithélium intestinal, les bactéries lactiques peuvent exercer un « effet barrière » vis-à-vis des pathogènes dans le tube digestif. Chez l'homme, les *Lactobacilli* ont aussi des effets immunomodulateurs. La consommation du yaourt stimule la

capacité des lymphocytes dans l'organisme humain. Une étude récente de Rosenfeldt et *al.*, (2004) a montré que l'administration de probiotiques (*L. rhamnosus* et *L. reuteri*) permet de stabiliser la fonction barrière de l'intestin et de diminuer les symptômes gastro-entériques chez les enfants souffrant d'une dermatite atopique. Cependant les mécanismes impliqués dans cette normalisation ne sont pas encore bien connus.

- Effet sur l'intolérance au lactose : L'un des effets bénéfiques des bactéries lactiques sur la santé humaine est l'amélioration de l'intolérance au lactose chez certains sujets déficients en lactase. De nombreuses études ont montré que la consommation de laits ou de yaourts enrichis en probiotiques améliore l'absorption de lactose chez les patients déficients en lactase et réduit les symptômes digestifs dus à l'intolérance au lactose. Jiang et *al.*, (1996) ont démontré que la consommation de laits contenant des souches de *Bifidobacterium longum* et *L. acidophilus* NCFM réduisent les symptômes de la mauvaise absorption de lactose chez des sujets humains suite à une élévation de la sécrétion de β -galactosidase.

- Effet sur l'influence de la cholestérolémie : L'effet des bactéries lactiques sur le métabolisme du cholestérol reste encore controversé. Alors que plusieurs études rapportent que la concentration en cholestérol sérique diminue pendant la consommation de grandes quantités (680 à 5000 mL/jour) de produits laitiers fermentés (Hepner et *al.*, 1979 ; Bazarre et *al.*, 1983) ; d'autres études démontrent que la consommation de laits fermentés n'a aucun effet sur la concentration en cholestérol sérique (Rossouw et *al.*, 1981 ; Thompson et *al.*, 1982). Gilliland (1990) a montré que plusieurs bactéries, notamment *L. acidophilus* et *B. longum*, sont capables de limiter le taux de cholestérol sanguin chez des porcs nourris avec un régime riche en cholestérol.

La consommation de *L. plantarum* 299 v et de *L. reuteri* CRL1098 entraînent également une diminution du taux de cholestérol dans le sang et par conséquent la réduction des risques responsables des maladies coronariennes (Bukowska et *al.*, 1998 ; Taranto et *al.*, 1998). Ces mêmes bactéries sont capables d'assimiler le cholestérol *in vitro* en présence de taurocholate de sodium (Dambekodi et Gilliland, 1998 ; Noh et *al.*, 1997). Une partie de ce cholestérol assimilé (environ 20 %) a notamment été retrouvée dans la membrane cellulaire de ces bactéries lactiques.

4-2-5-6 Amélioration de la qualité organoleptique des aliments fermentés

Une autre propriété importante des bactéries lactiques décrite dans la littérature est leur contribution au développement de la qualité organoleptique des aliments (Gobetti et *al.*, 1994, 1995 ; Meignen et *al.*, 2001). En effet, les produits formés au cours des réactions biochimiques se déroulant lors de la fermentation des aliments sont à l'origine de la saveur et de l'arôme de ces aliments. Ces réactions biochimiques complexes ont été et sont encore largement étudiées dans les produits alimentaires (Güzel-Seydim et *al.*, 2000 ; Akalin et *al.*, 2002 ; Banquis et *al.*, 2002 ; Kieronczyk et *al.*, 2004). Aussi des études ont montré le rôle majeur du catabolisme des acides aminés dans l'aromatization des fromages, notamment celui des acides aminés aromatiques, des acides aminés à chaîne carbonées ramifiée et de la L-méthionine.

Chez les bactéries lactiques, deux voies sont principalement impliquées dans la conversion de ces acides aminés en composés d'arôme : la première est initiée par une réaction d'élimination et la seconde par une réaction de transamination (Yvon et Rijnen, 2001). La production d'arôme par les réactions d'élimination se fait en une seule étape chez les bactéries lactiques. Ces réactions sont catalysées par des lyases, spécifiques d'un acide aminé. Chez certains *Lactobacilli* mésophiles et thermophiles, la synthèse d'acétaldéhyde est liée au métabolisme de la thréonine via une thréonine aldolase. La production d'arômes à travers les réactions de transamination des acides aminés sont assurées par des enzymes appelées des aminotransférases. Elles catalysent le transfert d'un groupement NH_2 d'un acide aminé vers un cétoacide. L'acide aminé est donc transformé en α -cétoacide, alors que l' α -cétoacide accepteur (le plus fréquemment l' α -cétoglutarate) est converti en l'acide aminé correspondant (glutamate). Bien que l' α -cétoglutarate soit le cétoacide préféré des transaminases chez *L. lactis*, un autre acétoacide tel que le pyruvate peut être également utilisé. Dans ce cas, les activités observées sont beaucoup plus faibles qu'avec l' α -cétoglutarate.

Par contre, chez certains *Lactobacillus*, le pyruvate est décrit comme un accepteur aussi efficace que l' α -cétoglutarate (Amàrita et *al.*, 2001). Toutes ces réactions conduisent à la production d'arômes dont l'acétoïne, l'acétaldéhyde et le diacétyle. Ces composés associés à l'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol, les exopolysaccharides issus du métabolisme des bactéries lactiques permettent de changer de texture, le goût, l'arôme et la flaveur des produits fermentés, action déterminante dans l'acceptabilité et la préférence d'un aliment par rapport à un autre (Raimbault, 1995 ; Akalin et *al.*, 2002).

4-2-5-7 Amélioration de la qualité nutritionnelle des aliments fermentés

Les bactéries lactiques améliorent la qualité nutritionnelle des aliments fermentés. Certains auteurs ont, en effet, observé que la fermentation traditionnelle des céréales réduisait la teneur en acide phytique et en polyphénols pour améliorer significativement la qualité des protéines tout en augmentant la teneur en lysine, la disponibilité des acides aminés essentiels, du fer, des minéraux et des vitamines du groupe B dont la thiamine, la niacine, l'acide folique, la digestibilité in vitro des protéines et celle des hydrates de carbone (Raimbault, 1995 ; Thaoge et *al.*, 2003 ; Bergqvist et *al.*, 2005). Elles fournissent les conditions optimales de pH pour la dégradation ou la réduction des phytates, tanins et oxalates présents dans les céréales et qui forment des complexes avec les cations polyvalents tels que le fer, le zinc, le cuivre, le calcium, le magnésium ainsi que les protéines et les vitamines du groupe B. En général, la fermentation naturelle conduit aussi à la diminution de la teneur en hydrates de carbone, en oligo et polysaccharides digestibles et réduit aussi le volume de la matière première à transporter. En Afrique, cette voie est beaucoup utilisée pour fabriquer les aliments de sevrage (Thaoge et *al.*, 2003).

Les bactéries lactiques activent également la synthèse de la vitamine C. Elles participent à la détoxification et à l'élimination des composés cyanogénétiques dans les aliments à base de manioc. Certaines souches possèdent la capacité d'hydrolyser la linamarase, principal composant des substances cyanogénétiques contenues dans le manioc. Par ailleurs l'organisme assimile mieux les minéraux en présence d'acide lactique (Raimbault, 1995).

4-2-6 *Lactobacillus*

4-2-6-1 Définition

Les *Lactobacillus* représentent un groupe très hétérogène parmi les bactéries lactiques tant au niveau de la flore commensale qu'au niveau industriel. Actuellement, ce genre compte plus de 80 espèces décrites (Coeuret et *al.*, 2003). Les *Lactobacillus* sont des bacilles Gram positif, pléomorphes, asporogènes, immobiles sauf rares exceptions (*L. agilis*). Leurs exigences nutritives sont complexes et variables selon les souches. Incapables de synthétiser les porphyrines, ils sont dépourvus de cytochrome oxydase et ne possèdent donc ni système respiratoire producteur d'énergie, ni catalase (Larpent, 1991 ; Gasser, 1993). La plupart des espèces sont cependant aérotolérantes, mais tous les degrés de sensibilité à l'oxygène peuvent se rencontrer jusqu'à l'anaérobie stricte (*L. ruminis*, *L. vitulinus*). Leur métabolisme énergétique est exclusivement

fermentaire et s'accompagne d'une forte acidification qui convient à leur pH optimum de croissance (environ de 5,5 pour la plupart des souches).

4-2-6-2 Classification et taxonomie

Le genre *Lactobacillus* appartient à la famille des *Lactobacillaceae*. Originellement, les *Lactobacilli* ont été classés en trois groupes ou sous genres par Orla-Jensen (1919). Cette classification, basée sur les caractères physiologiques demeure un outil important et est encore utilisée (Vandamme et *al.*, 1996).

Le groupe I ou sous-genre *Thermobacterium* comprend les *Lactobacilli* homofermentaires obligatoires thermophiles. Ils se développent à 45°C mais pas à 15°C et sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate.

Le groupe II ou le sous-genre *Streptobacterium* comporte des *Lactobacillus* hétérofermentaires facultatifs, mésophiles qui se développent à 15°C mais pas à 45°C. La fermentation des hexoses est homofermentaire mais peut être hétérofermentaire dans certains cas. Celles des pentoses et des gluconates sont hétérofermentaires avec une production d'acide lactique et d'acide acétique.

Le groupe III ou le sous-genre *Betabacterium* correspond aux *Lactobacilli* hétérofermentaires obligatoires dont les températures varient selon les espèces. La fermentation des hexoses produit de l'acide lactique, l'acide acétique (ou l'éthanol) et du CO₂ dans les proportions 1 : 1 : 1. Celle des pentoses, de l'acide lactique et de l'acide acétique (Kandler et Weiss, 1986 ; Gasser, 1993 ; Guiraud, 1998).

Les *Lactobacillus* sont aussi caractérisés par l'hétérogénéité de la composition de leur ADN car le pourcentage en GC varie entre 32 et 53% (Kandler et Weiss, 1986). Les études basées sur les ARN 16S ont permis de mettre en évidence l'existence de différents groupes phylogénétiques au sein des *Lactobacillus* qui ne se recoupent pas systématiquement avec la classification sur les profils fermentaires (Tableau 7). Les *Lactobacillus* sont subdivisés en trois groupes majeur phylogénétique selon Collins et *al.*, (1991). Dans le premier groupe constitué de *Lactobacillus delbrueckii*, le pourcentage d'homologie de la séquence ARNr 16S varie de 90,8 à 99,3%. Dans le second groupe, le pourcentage d'homologie de la séquence ARNr 16S varie de 90,3 à 99%. C'est le groupe de *Lactobacillus casei-Pediococcus*. Enfin, dans le troisième groupe constitué de *Leuconostoc*, le pourcentage d'homologie de la séquence ARNr 16S varie de 85,9 à 91,5%.

Tableau 7 : Subdivision du genre *Lactobacillus* selon les critères phénotypiques et génotypiques (Vandamme et *al.*, 1996)

Profils fermentaires	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
Groupe phylogénétiques	Homofermentaire obligatoire	Hétérofermentaire facultatif	Hétérofermentaire obligatoire
Groupe de <i>L. delbrueckii</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylophilus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. cripatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> , subsp <i>delbrueckii</i> , subsp <i>lactis</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L.</i> <i>kefiranofaciens</i> , <i>L. kefirgranum</i>	<i>L. acetotolerans</i> , <i>L. hamsteri</i>	
Groupe de <i>L. casei</i> - <i>Pediococcus</i>	<i>L. aviarius</i> subsp <i>aviarius</i> , subsp <i>araffinosus</i> , <i>L.</i> <i>faracinisis</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. salivaruius</i> , <i>L.</i> <i>sharpae</i> , <i>P. damnosus</i> , <i>P. dextrinicus</i> , <i>P.</i> <i>parvulus</i>	<i>L. agilis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. bifermentans</i> , <i>L. coryniformis</i> subsp <i>coryniformis</i> , subsp <i>torquens</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. graminis</i> , <i>L.</i> <i>homohiochii</i> , <i>L. intestinalis</i> , <i>L.</i> <i>murinus</i> , <i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> , subsp <i>tolerans</i> , <i>L.</i> <i>pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L.</i> <i>rhamnosus</i> , <i>L. sake</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>	<i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L.</i> <i>fermentum</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. malefermentans</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L.</i> <i>parakefir</i> , <i>L. suebicus</i> , <i>L. sanfrancisco</i> , <i>L.</i> <i>vaccinostercus</i> , <i>L. vaginalis</i> <i>L. fructosus</i> , <i>W. confusus</i> (<i>L. confusus</i>), <i>W.</i> <i>halotolerans</i> (<i>L. halotolerans</i>), <i>W. kandleri</i> (<i>L.</i> <i>kandleri</i>), <i>W. minor</i> (<i>L. minor</i>), <i>W. viridescens</i> (<i>L. viridescens</i>), <i>W. hellenica</i> , <i>W.</i> <i>paramesentoides</i> (<i>Ln. Paramesentoides</i>), <i>Ln.</i> <i>Amelibiosum</i> , <i>Ln. Argentium</i> , <i>Ln. Lactis</i> , <i>Ln.</i> <i>Mesenteroides</i> , <i>Ln. Pseudomesenteroides</i> , <i>Ln.</i> <i>Gelidum</i> , <i>Ln. Carnosus</i> , <i>Ln. Fallax</i> , <i>O. oeni</i>
Groupe de <i>Leuconostoc</i>			

4-2-6-3 Habitat et écologie

De part leur diversité, les *Lactobacillus* sont des germes ubiquistes. Ils sont nombreux et abondants dans la cavité orale (*L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. oris*, *L. salvarius*) et dans l'intestin des hommes (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*). Ils constituent l'hôte normal du vagin de la femme saine (*L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. iners*, *L. vaginalis*). Une telle flore joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre de la flore commensale et donc sur la santé de l'hôte (Walter et al., 2001 ; Karaoğlu et al., 2003 ; Isolauri, 2004). Certaines espèces sont utilisées comme des probiotiques (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*). Les *Lactobacillus* sont également présents dans l'environnement, la poussière, l'ensilage, les ustensiles, dans les eaux de surface et dans les eaux usées, sur les produits végétaux (Larpen, 1991 ; Gasser, 1993 ; Vadamme et al., 1996 ; Stiles et al., 1997).

Les *Lactobacillus* sont des agents de fermentation lactique (Tableau III) utilisés dans les industries agroalimentaires notamment :

- dans l'industrie laitière comme ferment acidifiant et comme producteurs d'arômes (*L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. hilgardii*, *L. kéfir*).
- en fromagerie, ils jouent un rôle important dans la maturation de nombreux fromages (*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. helveticus*).
- dans les pâtes à pain traditionnel, ils contribuent à l'acidification et au goût de la pâte (*L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. sanfransisco*).
- en salaison, ils entraînent une forte baisse du pH du milieu participant ainsi à la protection de ces produits contre l'envahissement par d'autres espèces microbiennes notamment les anaérobies putréfaisants (*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. sakei*).

Les *Lactobacillus* participent aussi à la conservation et à l'amélioration des qualités hygiéniques, nutritionnelles et organoleptiques des aliments traditionnels africains dans lesquels ils interviennent (*agbelima*, *attiéké*, *burukutu*, *chibuku*, *dolo*, *gari*, *gowé*, *kisra*, *togwa*, *pito*). Cependant, certaines espèces sont aussi de redoutables germes d'altération. Ils peuvent provoquer le surissement dans la bière (*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*), donner des saveurs désagréables dans les jus de fruit (*L. brevis*, *L. plantarum*), entraîner le verdissement et l'acidification des produits carnés (*L. sakei*, *L. plantarum*, *L. viridescens*) (Borch et al., 1988 ; Curk et al., 1993 ; Gasser, 1993 ; Elmer et al., 1996).

4-2-6-4 Identification des *Lactobacillus*

4-2-6-4-1 Identification phénotypique

a- Caractères morphologiques

Les *Lactobacillus* sont des bacilles Gram positif dont la longueur peut varier à l'extrême, allant des formes bâtonnets, longues (qui sont en fait des chapelets de cellules non séparées) jusqu'aux formes coccoïdes si courtes qu'ils deviennent alors difficile d'apprécier s'il s'agit de bacilles très courtes ou de cocci allongés. Ce sont des bactéries pléomorphes, non sporulées, acapsulées, immobiles sauf rare exception (*L. agilis*), groupées en paire ou en chaînette ou en amas. La coloration de Gram se perd facilement lorsque la culture vieillie (Bourgeois et Leveau, 1991 ; Larpent, 1991 ; Gasser, 1993). Les variations morphologiques des *Lactobacillus* sont importantes. Leur déterminisme est parfois connu. Ainsi une population de *L. acidophilis* est constituée uniquement de bactéries courtes aux concentrations optimales en vitamines B₁₂ ou en précurseur, alors que la culture en concentration limitante donne uniquement des formes longues et enchevêtrées. Chez *L. bulgaricus*, cultivé en concentration optimale en magnésium, la carence en calcium et en manganèse entraîne la formation de longues chaînes.

b- Caractères cultureux

Conditions de culture

Incapables de synthétiser les produits indispensables à leur développement, les *Lactobacillus* ont des exigences complexes sur le plan nutritionnel concernant les acides aminés, les peptides, les vitamines et les acides gras. Ils ne cultivent pas sur les milieux ordinaires ; ils réclament et tolèrent des pH bas ($\text{pH} \leq 5,5$) pour se multiplier. Ce sont donc des microorganismes acidophiles. En effet, la croissance des *Lactobacillus* est bonne dans un milieu à pH 4,5-6,4. Ils préfèrent des atmosphères enrichies en CO₂, la microaérobiose ou même l'anaérobiose. Pour cela il est préférable d'effectuer l'isolement et la numération par la technique de la double couche de gélose en boîte de Pétri ou bien de façon plus pratique par l'étalement en surface de la gélose et l'incubation en atmosphère anaérobiose stricte. Ils se développent pendant 48 à 72 h à 30°C ou à une température supérieure pour les *Thermobacterium* (Bourgeois et Leveau, 1991 ; Larpent, 1991 ; Gasser, 1993).

Milieux de culture

Le milieu de culture liquide le plus connu pour la croissance des *Lactobacillus* est le bouillon MRS (Man Rogosa Sharpe). Le bouillon microinoculum, le bouillon de Briggs, le bouillon à la tomate et le bouillon Elliker conviennent également à leur culture.

La gélose MRS est employée en routine pour l'isolement et le dénombrement des *Lactobacillus*, mais elle est peu sélective. La supplémentation par les agents réducteurs tels que la cystéine (0,05%) ou l'actidione (0,025) dans la gélose améliore sa spécificité. La gélose MRS peut également être additionnée de TTC (Triphényl Tetrazolium Chlorure) ou le vert de bromocrésol, qui sont des indicateurs de pH permettant une meilleure différenciation. La gélose Rogosa est un milieu plus sélectif qui permet l'isolement des *Lactobacillus* associés à d'autres genres de microorganismes acidophiles dans les aliments fermentés (Anonyme 1, 1987 ; Guiraud, 1998 ; Guiraud et Galgy, 1980 ; Coeuret et *al.*, 2003).

Il existe également des kits d'identifications des espèces de *Lactobacillus*. Parmi ces milieux, la galerie API 50 CHL est couramment utilisée. Elle permet d'identifier les espèces de *Lactobacillus* par la fermentation des hydrates de carbonés.

Aspect des colonies de *Lactobacillus* sur gélose MRS

D'un diamètre de 0,5 à 1 mm, les colonies sont soit de type R (Rough), rugueuses, à bords découpés, grises, soit de type S (Smooth), lisses, opaques, bombées ou étalées, plus ou moins blanches, blanchâtres, incolores ou jaunâtre (Anonyme 1, 1987 ; Gasser, 1993).

c- Caractères Biochimiques

Les *Lactobacillus* sont dépourvus de catalase, ne possèdent pas de cytochrome oxydase, ne transforment pas les nitrates en nitrites. Ils sont peu lypolytiques, peu protéolytiques. Certaines espèces sont amylolytiques (Bourgeois et Leveau, 1991 ; Raimbault, 1995). Les espèces sont principalement différenciées par leur profil de fermentation des glucides. En effet, la fermentation des sucres entraîne la formation de nombreux produits dont la nature traduit le métabolisme des souches. Elle les fait distinguer en trois groupes : les homofermentaires obligatoires, les hétérofermentaires facultatives et les hétérofermentaires obligatoires. La production de CO₂ est fondamentale pour distinguer les groupes (Guiraud et Galgy, 1980). L'identification peut aussi se faire par les méthodes de la biologie moléculaire.

4-2-6-4-2 Identification génotypique

Les techniques basées sur l'analyse de l'ADN permettent une meilleure différenciation des microorganismes à différents niveaux, allant du genre jusqu'à la souche en fonction des méthodes utilisées. En général, elles ont l'avantage sur les méthodes d'identification phénotypique de ne pas être influencées par les conditions de culture (Gevers, 2002). Le séquençage direct du gène d'ARNr 16S est l'une des méthodes les plus puissantes pour l'identification en une seule étape d'une souche inconnue. Toutefois, il existe quelques limites (Vandamme et *al.*, 1996; Rossello-Mora et Amann, 2001). A titre d'exemple certaines espèces qui sont différentes peuvent avoir les mêmes séquences de l'ADNr 16S et la fiabilité de certaines séquences hébergées dans la base de données peut être discutable. Les méthodes de typage des souches deviennent de plus en plus importantes dans l'étude des bactéries lactiques. Les méthodes génotypiques utilisées pour le typage comprennent PFGE de l'ADN chromosomique digéré, ribotypage, profil plasmidique et les méthodes de typage (empreintes digitales) basées sur PCR telles que les RAPD, AFLP et rep-PCR.

4-2-6-4-3 Le ribotypage

Il associe l'analyse de l'ADN chromosomique par des enzymes de restriction avec l'utilisation de sondes ADN recombiné. Ce qui permet de différencier entre les différentes espèces (Johansson et *al.*, 1995a; Rodtong et Tannock, 1993; Björkroth et Korkeala, 1996 ; Lyhs et *al.*, 1999). Le pouvoir discriminatoire de la méthode dépend du nombre et du type de sondes d'oligonucléotides et enzymes de restriction utilisées. Le ribotypage a été particulièrement utilisé pour révéler les hétérogénéités entre des souches à faible homologie (Roussel et *al.*, 1993).

4-2-6-4-4 Le profil plasmidique

La variation du nombre et de la taille des plasmides hébergés par des souches de la même espèce, est utile pour typer les bactéries lactiques car la plupart des souches de ce groupe semblent contenir plusieurs plasmides (Dykes et von Holy, 1994 ; Holzapfel et *al.*, 2001). Cependant, cette méthode de typage est affectée par la capacité des souches à perdre ou à gagner des plasmides.

4-2-6-4-5 Méthodes des empreintes digitales (fingerprinting)

4-2-6-4-5-1 L'électrophorèse en champs pulsé de l'ADN chromosomique digéré (Puled Field Gel Electrophoresis)

Cette technique est souvent considérée comme la meilleure des méthodes de typage moléculaire, car elle a un pouvoir discriminatoire puissant et une plus grande reproductibilité (Tenover et *al.*, 1995). Cependant, cette méthode assez laborieuse nécessite une approche spécifique à chaque espèce (différentes enzymes de restriction et conditions d'électrophorèse). Elle est donc principalement utilisée pour étudier la diversité intra-spécifique et vérifier l'origine des souches (clonalité) (McCartney, 2002).

4-2-6-4-5-2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Considérée comme une méthode rapide, sensible et moins coûteuse pour le typage des différentes souches de bactéries lactiques (Ben Amor et *al.*, 2007). Elle a été utilisée avec succès pour différencier les bactéries lactiques au niveau intra-spécifique (Johansson et *al.*, 1995b ; Berthier et Ehrlich, 1999), au niveau inter-spécifique pour les Entérocoques (Descheemaeker et *al.*, 1997), Pediocoques et les Lactobacilles (Du Plessis et Dicks, 1995; Gancheva et *al.*, 1999; Khaled Daud et *al.*, 1997 ; Nigatu et *al.*, 2001), et au niveau inter-genre (Cocconcelli et *al.*, 1995 ; Moschetti et *al.*, 2001 ; Yost et Nattress, 2002). Cependant, des amorces avec un fort pouvoir discriminatoire et une large applicabilité dans un grand groupe d'espèces de bactéries lactiques n'ont pas été décrites. La RAPD n'est pas approprié pour la construction d'une base de données pour l'identification.

4-2-6-4-5-3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Cette technique a été signalée comme l'un des outils les plus reproductibles permettant de discriminer les souches au niveau de l'espèce et intra-spécifique (Janssen et *al.*, 1996) et son utilisation est en augmentation (Torriani et *al.*, 2001; Gancheva et *al.*, 1999; Bruinsma et *al.*, 2002; Borgen et *al.*, 2002 ; Vancanneyt et *al.*, 2002).

4-2-6-4-5-4 repetitive extragenic palindromic-Polymerase Chain Reaction (rep-PCR)

Les séquences répétitives existent en multiples copies dans le génome de la plupart des bactéries Gram négatifs et Gram positifs (Lupski et Weinstock, 1992). Trois types de séquences répétitives ont été identifiés chez les bactéries : des séquences répétitives inversées

REP (Sharples et Lloyd, 1990), des consensus entérobactériens à séquences répétitives intergéniques ERIC (Hulton et *al.*, 1991) et les éléments BOX (Versalovic et Lupski, 1998). Ces séquences sont localisées en orientation inverse dans des zones distinctes sur le chromosome bactérien. Ces séquences paraissent hautement conservées chez les souches apparentées et très distinctes entre les différentes espèces ou genres bactériens (Versalovic et *al.*, 1991, 1992). L'amplification sélective des régions existant entre ces séquences conservées génèrent des amplicons de tailles variables qui seront séparés par électrophorèse sur gel d'agarose ensuite comparés aux profils des souches de référence (Heyndrickx et *al.*, 2007). Pour les bactéries lactiques l'amorce (GTG)₅ est considérée comme une très bonne approche pour le typage et l'identification des *Lactobacillus* et des *Enterococcus* (Gevers et *al.*, 2001 ; Svec et *al.*, 2005).

MATERIEL ET METHODES

1- Matériel biologique

Le matériel végétal utilisé est constitué de la sève fraîche de palmier à huile. Il est obtenu à partir de l'exploitation des palmiers à huile (*Elaeis guineensis*) composés de deux (2) variétés de palmiers à huile dont les variétés *Dura* et *Tenera*. La variété *Dura* est un palmier dont la coque des graines est épaisse alors que celle des graines de la variété *Tenera* est mince. Il faut noter que la variété *Tenera* est un hybride des variétés, *Dura* et *Pisifera* et qu'elle présente des avantages économiques pour les différentes sociétés d'exploitation d'huile de palme grâce à son pourcentage de pulpe élevé. Des palmiers cultivés en plantations industrielles sont en général des variétés hybrides *Tenera*. Les palmiers ont été abattus sur le site de l'Université Nangui Abrogoua pendant 5 mois. Les sèves fraîches ont été collectées tous les jours sur chaque variété.

2- Méthodes

2-1 Extraction du vin de palme à partir d'un palmier à huile abattu

Des pieds de palmiers ont été déracinés et laissés pendant une semaine pour que la sève se concentre. Une partie des feuilles est éliminée jusqu'au niveau de la tige principale où une incision est pratiquée de façon transversale. Cette zone d'incision a l'aspect d'un creuset au niveau du tronc. La zone d'incision laisse apparaître la section de la tige principale évoluant vers le tronc, surface qui sera entaillée à chaque collecte (matin et soir). L'entaille est par la suite recouverte à l'aide de la partie basale des nervures principales des feuilles aménagées à cet effet. Une percée est ensuite pratiquée dans le creuset non loin de la partie évoluant vers le tronc. Un tuyau en bambou y est inséré et l'autre bout plonge dans un bidon ou un pot en terre cuite afin de recueillir la sève qui s'écoule. Le palmier est ainsi préparé pour faire l'extraction de la sève (figure 6).



Figure 6 : Méthode d'extraction du vin de palme (Karamoko Detto)

2-2 Echantillonnage

Le vin de palme est obtenu à partir de l'exploitation de palmiers à huile (*Elaeis guineensis*) de deux (2) variétés dont les variétés *Dura* et *Tenera*. Les prélèvements ont été réalisés tôt le matin aux environs de 7 heures sur le site de l'Université Nangui Abrogoua. Les vins récoltés sont renversés dans un bidon de 4 litres stérilisé avec de l'eau de javel et fermé hermétiquement. Les vins recueillis dans un bidon sont ensuite transportés immédiatement au laboratoire où des analyses des paramètres physicochimiques et microbiologiques ont été effectuées. L'étude a porté dans un premier temps sur le vin de palme pendant l'exploitation des palmiers et dans un second temps sur le vin de palme pendant stockage.

Pendant l'exploitation du « vin de palme », des prélèvements ont été faits tous les trois jours sur chaque variété de palmier. Les travaux ont été réalisés pendant quatre (4) semaines, soit environ un (1) mois. Cette expérience a été réalisée sur six (6) palmiers dont trois (3) palmiers de variétés *Dura* et trois (3) palmiers de variétés *Tenera*. Trente (30) prélèvements ont été faits sur chaque souche de palmier à raison de dix (10) prélèvements par palmier. Pour les deux variétés de palmiers utilisées, 60 échantillons ont été recueillis. Les prélèvements des différents échantillons de vins du 1^{er} au 28^{ème} jour ont été réalisés sur les mêmes palmiers pour chaque variété.

Pendant le stockage des vins de palme, des prélèvements ont été faits toutes les semaines sur les palmiers de la variété *Dura*. Ainsi, les vins V0, V1, V2, V3 et V4 désignent respectivement les vins du premier, 7^{ème}, 14^{ème}, 21^{ème} et 28^{ème} jour. Trois (3) palmiers de variété *Dura* ont été utilisés pour cette expérience. Douze (12) prélèvements ont été faits pendant les quatre (4) semaines d'exploitation sur les palmiers à huile de la même variété abattus à cet effet à raison de cinq (5) prélèvements par palmier. Pour chaque prélèvement, le vin frais du palmier est reparti dans cinq (5) pots stériles de 200 mL et déposés dans le laboratoire à température ambiante (28 à 30°C) pendant 32 heures. Les différentes sèves contenues dans les pots fermés avec du coton cardé entrent en fermentation spontanée. Par intervalle de huit (8) heures un pot est utilisé pour effectuer les différentes analyses.

2-3 Evaluation des paramètres physico-chimiques

2-3-1 Mesure de l'intensité de la fermentation

L'intensité de la fermentation a été mise en évidence à l'aide du bioréacteur proposé par Pol (1996). Elle a été mesurée grâce au dégagement de gaz produit au cours de la fermentation. Le dégagement de gaz est réalisé à l'aide d'un bioréacteur composé d'un

erlenmeyer de 500 mL dans lequel sont introduits 200 mL de sève fraîche de palmier à huile. Le bioréacteur est fermé hermétiquement avec un bouchon muni d'un tuyau. Ce tuyau relie le bioréacteur à un autre erlenmeyer contenant de l'eau distillée additionnée de 1‰ d'acide chlorhydrique qui a pour rôle d'empêcher la dissolution des molécules de CO_2 dans l'eau. Ce tuyau permet au gaz dégagé au cours de la fermentation de rejoindre le second erlenmeyer. Ce second erlenmeyer est aussi fermé hermétiquement avec un bouchon et est muni en plus du premier tuyau, d'un autre tuyau qui est plongé dans le liquide et relié à une éprouvette graduée (Figure 7).

Le gaz produit au cours de la fermentation exerce une pression sur l'eau du second erlenmeyer entraînant un déplacement d'eau vers l'éprouvette graduée. Ainsi le volume d'eau mesuré dans l'éprouvette est proportionnel au volume de gaz dégagé au cours de la fermentation.

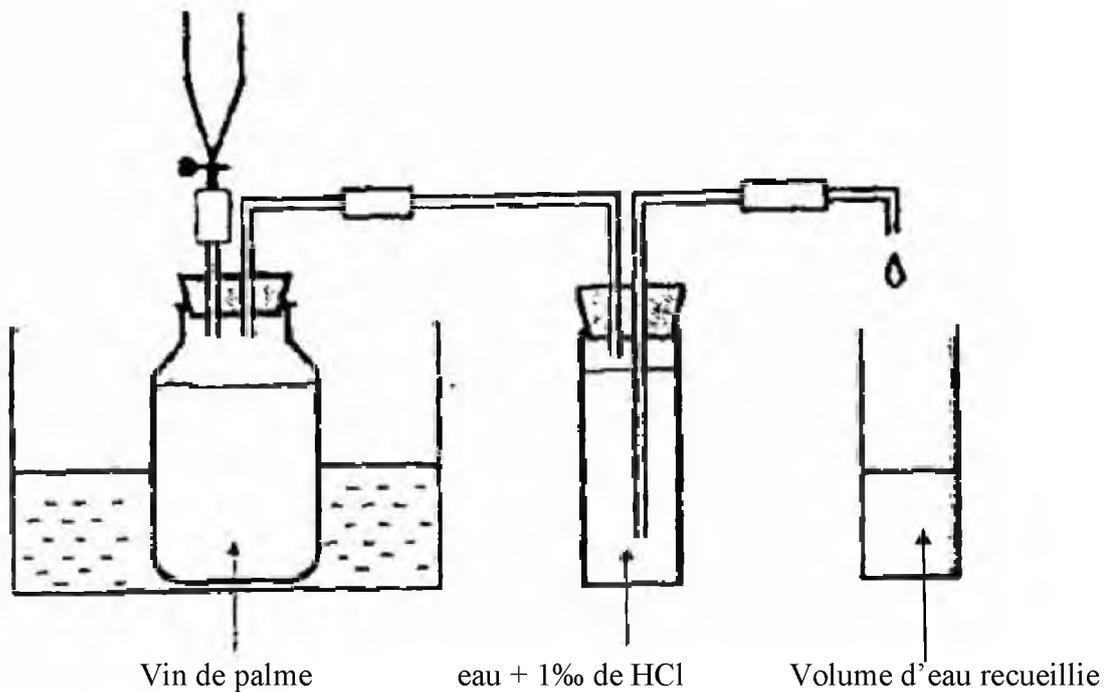


Figure 7 : Montage à lecture indirecte du volume de gaz produit au cours de la fermentation du vin de palme

Source : Pol, 1996

2-3-2 Détermination du pH

Le pH est le logarithme de l'inverse de la concentration des ions hydrogènes réalisé par la méthode de Le coq Raoul en 1965. Le pH des échantillons est déterminé directement à l'aide d'un pH- mètre (pH- meter P604 consort, bio block, France). L'étalonnage de l'appareil est assuré par l'usage de deux solutions tampon à pH 7 et 4 et il est fait systématiquement avant les mesures du pH. La mesure s'effectue en plongeant l'électrode dans 20 mL de sève fraîche de palmier à huile. La lecture est répétée trois fois.

2-3-3 Détermination de l'acidité titrable

L'acidité titrable est obtenue par la méthode décrite par Amoa-Awua et *al.* (2007). Cette acidité est réalisée par dosage de 10 mL de l'échantillon avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N après ajout au préalable de 2 à 3 gouttes de phénophtaléine à 1%. La fin du dosage est marquée par une coloration rose pâle. Les résultats obtenus constituent la moyenne de trois essais. Le taux d'acidité est exprimé en pourcentage et déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ acidité titrable} = \frac{\text{Vol}_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times 0,09 \times 100}{\text{Vessai}}$$

Vol_{NaOH} = Volume de la solution d'hydroxyde de sodium (mL)

N_{NaOH} = Normalité de la solution d'hydroxyde de sodium (még/L)

Vessai = Volume de prise d'essai (mL)

0,09 = milliéquivalent gramme d'acide lactique

2-3-4 Détermination des sucres totaux

a- principe

En présence du phénol et de l'acide sulfurique concentré, les sucres se déshydratent en formant des furfurals qui réagissent avec le phénol pour donner un complexe jaune dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des sucres totaux présents dans le milieu.

b- Dosage

Les sucres totaux ont été dosés par la méthode proposée par Dubois et *al.*, (1956). Un millilitre de phénol et 5 mL d'acide sulfurique (en jet sec) sont ajoutés à 1 mL de sève de palmier prélevé pour chaque essai. Deux essais ont été réalisés pour chaque échantillon. Le tout est porté au bain-marie bouillant pendant 5 min. Après retrait, les tubes sont mis à l'obscurité pendant 30 min et la densité optique est lue à la longueur d'onde de 490 nm au spectrophotomètre (WANELENGHT). La quantité de sucres totaux est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie à l'aide d'une solution de glucose à 1 mg / mL.

2-3-5 Détermination des sucres réducteurs

a- Principe

Les pentoses et les hexoses, sous l'effet de la chaleur se transforment en furfural en présence de dérivés phénoliques produisent une coloration spécifique avec les sucres réducteurs. Dans cette méthode, le dérivé phénolique est l'acide 3,5 dinitrosalicylate.

b- Dosage

Les sucres réducteurs ont été dosés par la méthode décrite par Bernfeld en 1955. Le dosage des sucres réducteurs est réalisé en deux essais comprenant respectivement 0,3 mL et 0,6 mL de vin de palme. Les essais sont ensuite complétés à 2 mL avec de l'eau distillée, 1 mL de DNS est ajouté dans chaque tube. Les tubes sont mis au bain marie bouillant pendant 5 minutes. Après refroidissement des tubes, 10 mL d'eau distillée sont ajoutés au contenu. La densité optique de chaque tube est lue à 546 nm au spectrophotomètre (GENESYS 5). La quantité de sucres réducteurs est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie à l'aide d'une solution de glucose + fructose à 1 mg / L.

2-3-6 Détermination de la viscosité

La viscosité des différents vins de palme a été déterminée selon la méthode d'Osuwa et *al.* (2008). Cette viscosité est déterminée en utilisant le viscosimètre à chute de bille de marque HAAKE. Il permet de mesurer des valeurs précises de viscosité des liquides transparents et des gaz. Il répond aux exigences de la norme allemande DIN 53015 ainsi que les normes ISO 12058 et accepté comme un instrument de référence officiel. Ce viscosimètre

est constitué de deux tubes cylindriques en verre ; l'un des deux tubes étant inclu dans l'autre. La détermination de la viscosité de chaque échantillon est réalisée en deux essais. Quarante millilitres (40 mL) de vin de palme sont introduits dans le petit tube. Lorsque le petit tube est rempli avec le vin de palme, à un temps T_0 la bille est introduite dans le tube. Dès que la bille atteint le fond du tube, un autre temps T_1 est ensuite relevé. La viscosité de l'échantillon est en corrélation avec le temps nécessaire que met la bille pour parcourir une distance définie (figure 8). Les résultats des tests de la viscosité sont exprimés en centi Poise (cP).

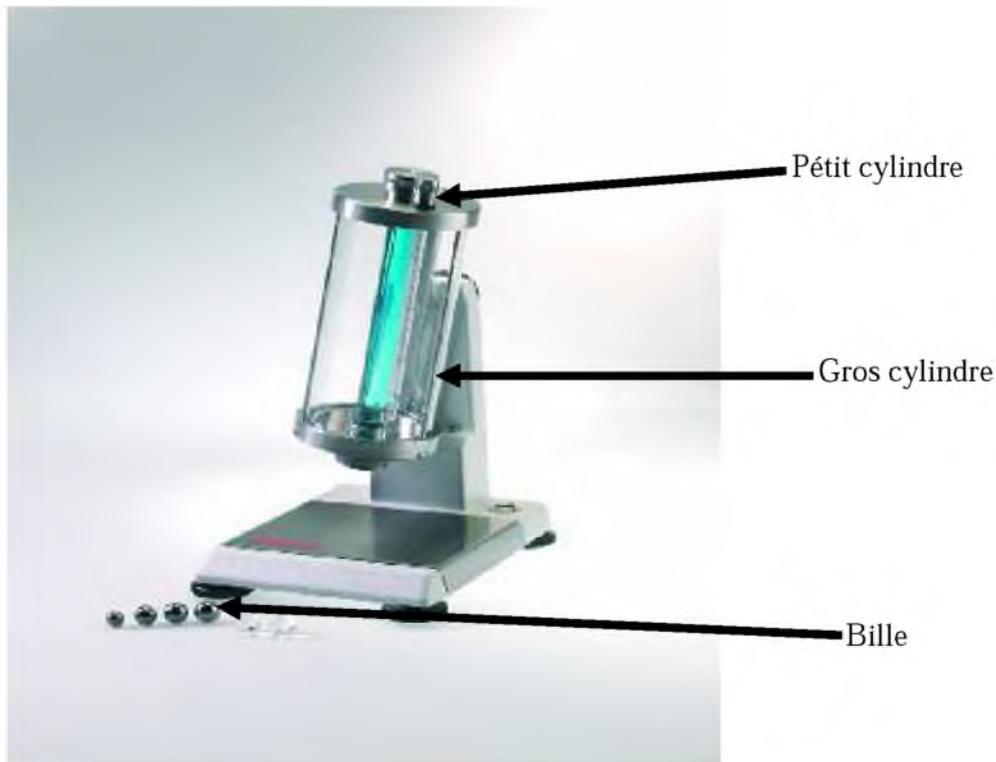


Figure 8 : Photographie d'un viscosimètre à chute de bille (Osuva et *al.*, 2008)

2-3-7 Détermination de l'éthanol

La teneur en éthanol est déterminée par la méthode de chromatographie en phase gazeuse (CPG) décrite par N'guessan et *al.*, (2008). Cette détermination est réalisée en utilisant un chromatographe de marque Shimadzu CG-14A équipé d'une colonne Porapak Q 100/120 en verre. L'injecteur et le détecteur sont à des températures de 200°C et 250°C respectivement. L'hélium avec un débit de 2 kg/cm² est utilisé comme gaz vecteur. Les échantillons prélevés sont centrifugés à 4000 trs/min pendant 30 min et filtrés à l'aide d'une membrane millipore de 0,45 µm de diamètre (Sartorius AG, Gottingen, Allemagne) puis injectés sans aucun autre traitement. La détermination quantitative de l'éthanol est effectuée par la méthode standard externe tandis que la détermination qualitative est basée sur le temps

de rétention. Les concentrations sont exprimées en mg/L pour les composés volatils et en pourcentage (%) de volume pour l'éthanol. Les temps de rétention des solutions de référence sont consignés dans le tableau 8.

2-3-8 Détermination des acides organiques

2-3-8-1 Préparation des échantillons

Les acides organiques sont déterminés par la méthode décrite par Karadeniz en 2004. Ils sont déterminés par chromatographie en phase liquide (HPLC). Les échantillons de vin de palme sont centrifugés à 4000 trs/min pendant 30 min et filtrés sur filtre millipore 0,45 µm ou 0,2 µm (Sartorius AG, Goettingen, Germany). Les échantillons ainsi traités sont conservés à -20°C avant les analyses. Les solutions standards d'acides organiques (acides oxalique, citrique, malique, tartrique, lactique, acétique, ascorbique, fumarique et propionique) sont préparées individuellement avec de l'eau bi-distillée et filtrées dans les mêmes conditions que les échantillons.

2-3-8-2 Equipement et conditions opératoires

L'appareil HPLC (Shimadzu Corporation, Japon) est constitué d'une pompe (Shimadzu LC-6A Liquid Chromatograph), d'un détecteur UV (Shimadzu SPD-6A UV Spectrophotometric detector) et d'un intégrateur (Shimadzu C-R 6A Chromatopac).

La séparation chromatographique est réalisée avec une colonne d'exclusion ionique ORH-801 (300 mm x 6,5 mm, Interchrom, France) maintenue à 35°C à l'aide d'un four MetaTherm™ (Interchrom, France). L'éluant est de l'acide sulfurique 0,004 N à une vitesse d'élution de 0,8 mL/min et le détecteur est sélectionné à 210 nm. Un volume de 20 µL des échantillons centrifugés et filtrés est injecté pour l'analyse HPLC. Les analyses sont effectuées en double. Les étalons d'acides organiques sont préparés dans de l'eau distillée à des concentrations de 0,005 à 0,4 g/L. Les solutions standards d'acides organiques sont filtrées et injectées séparément. Les différents composés sont identifiés et quantifiés en comparant les temps de rétention et les aires des pics des étalons à ceux obtenus dans les échantillons. Les concentrations ont été déterminées à partir de la moyenne des surfaces des pics des solutions de référence et celles des différents composés élués. Les concentrations sont exprimées en g/L. Les temps de rétention (en minutes) des solutions de référence sont consignés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Solutions de référence analysées par HPLC et CPG (N'guessan, 2009)

Composés		Concentrations	Temps de rétention (min)
Acides organiques	Acide oxalique	0,3 g/L	3,08
	Acide citrique	0,3 g/L	4,21
	Acide tartrique	0,3 g/L	4,5
	Acide malique	0,4 g/L	5,18
	Acide ascorbique	0,4 g/L	5,7
	Acide lactique	0,3 g/L	6,6
	Acide acétique	0,4 g/L	7,38
	Acide fumarique	0,05 g/L	8,57
	Acide propionique	0,4 g/L	9,47
Composés volatils	Acétaldéhyde	0,039 mg/mL	3,76
	Méthanol	0,103 g/10 mL	5,98
	Ethanol	24 mg/100 mL	6,01
	Propanol	0,104 g/10 mL	6,24
	Méthyle éthyle cétone	0,04 mg/mL	19,02
	Acétate d'éthyle	0,045 mg/mL	19,88

2-4 Evaluation des paramètres microbiologiques

2-4-1 Recherche et dénombrement des microorganismes

2-4-1-1 Préparation de la solution mère et des dilutions

La sève prélevée initialement au pied du palmier à huile a été utilisée comme solution mère. A partir de cette solution mère, plusieurs dilutions décimales sont réalisées. Pour préparer la dilution 10^{-1} , 1 mL de la solution mère est prélevé dans les conditions stériles auprès de la flamme d'un bec bensen à l'aide d'une pipette stérile et mis dans un tube à essai stérile contenant 9 mL d'eau peptonée tamponnée (EPT) (AES Laboratoire, COMBOURG France). De cette dilution, 1 mL est ensuite prélevé et mis dans un autre tube à essai contenant 9 mL d'eau peptonée tamponnée. La dilution obtenue est alors 10^{-2} . Par la même technique, les dilutions allant de 10^{-2} à 10^{-8} sont obtenues.

2-4-1-2 Dénombrement des germes aérobies mésophiles (GAM)

(Norme AFNOR NF v08- 051)

Le milieu utilisé pour le dénombrement des germes aérobies mésophiles (GAM) est la gélose PCA (Plate Count Agar) (Oxoid LTD, Basingstore, Hampshire, England). L'ensemencement se fait par étalement de 1 mL de la solution- mère ou des dernières dilutions décimales sur boîte de Pétri. Ensuite 12 à 15 mL de la gélose PCA préalablement fondu et refroidi et conservé en surfusion à 45°C sont coulés dans la boîte contenant l'inoculum. Le mélange est homogénéisé par agitation lente puis est laissé refroidir sur la paillasse à la température de la salle. Après solidification, sur la première couche, il est coulé une deuxième couche de 4 à 5mL de gélose PCA pour éviter l'envahissement des boîtes par certains germes. L'incubation des boîtes de Pétriensemencées se réalise à 30°C et la lecture se fait toutes les 24 heures jusqu'à 72 heures. Le dénombrement des colonies se fait en comptant toutes les colonies présentes dans les boîtes de Pétri contenant entre 30 et 300 colonies.

2-4-1-3 Dénombrement des levures

(Norme NF ISO 6611)

Le milieu utilisé pour le dénombrement des levures et moisissures est la gélose Sabouraud Chloramphénicol (Fluka, Bochemica 89579, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, India). Le Chloramphénicol est un antibiotique ajouté pour freiner la croissance des bactéries. L'intérêt de ce milieu est basé sur le fait que la croissance des levures et moisissures est

favorisée par des substances nutritives apportées par la peptone, les facteurs de croissances de l'extrait de levure et le glucose utilisé comme source énergétique. Sur le milieu solidifié en boîte de Pétri, 0.1 mL de la suspension- mère ou des dilutions retenues est déposé à la surface de la gélose préalablement coulée puis étalé à l'aide d'un râteau étaleur. Les boîtes de Pétri sont placées à l'étuve à 30°C pendant 24 à 72 heures pour l'incubation. Les colonies se présentent sous formes de duvets pour les moisissures et blanchâtres, lisses, bombées pour les levures avec une odeur caractéristique de boulangerie et un diamètre de 0,5 à 2 mm. Le dénombrement des colonies se fait en comptant les colonies présentes dans les boîtes de Pétri contenant entre 30 et 300 colonies.

2-4-1-4 Dénombrement des bactéries lactiques

(Norme AFNOR NF v08-051)

Le milieu utilisé pour le dénombrement des bactéries lactiques est la gélose MRS (Man Rogosa Sharp) (MRS, De Man et *al.*, 1960). Sur le milieu solidifié en boîte de Pétri, 0.1 mL de la suspension-mère ou des dilutions retenues est déposé à la surface de la gélose préalablement coulée puis étalé à l'aide d'un râteau étaleur. Les boîtes de Pétri sont incubées en anaérobiose pendant 48 à 72 heures à 30°C pour l'incubation. Le dénombrement des colonies se fait en comptant les colonies comprises entre 30 et 300 colonies.

a) Caractères morphologiques et physiologiques

Les colonies prélevées dans les boîtes de Pétri à fortes dilutions ont été soumises aux observations microscopiques à l'état frais puis après à la coloration de Gram. Les bacilles Gram positif et immobiles (caractéristiques différentielles de base de genre *Lactobacillus*) ou cocci ont été retenus pour la suite du travail. Ces différents germes isolés sont repiqués à nouveau sur des géloses MRS (Man Rogosa Sharp) coulées dans des boîtes de Pétri jusqu'à l'obtention de cultures pures. Les bactéries lactiques ainsi isolées sont mises en culture pendant deux jours à 30°C dans 3 mL de bouillon MRS stérile. Des aliquotes de 800 µL sont prélevés et additionnés de 200 µL de glycérol. Les cryotubes sont alors placés au congélateur (-80°C) en position oblique pour les études ultérieures.

Les souches pures de bactéries lactiques ainsi obtenues ont été testées pour leurs capacités à croître à 15°C, 45°C et à 51°C dans du bouillon MRS par l'observation de la turbidité. La production du gaz a été testée à partir de la cloche de DURHAM et la croissance sur les milieux sélectifs tels que la gélose BEA (Bile esculine agar) et le milieu Mayeux Sanidine Elliker dit « mayeux » (AES, Combours, France).

Pour les cultures sur milieux sélectifs, les ensemencements ont été réalisés par stries à la surface des milieux et les boîtes de Pétri ensemencées sont incubées à 30°C et la lecture se fait toutes les 24 heures jusqu'à 72 heures. La tolérance au sel a été aussi testée dans le bouillon MRS supplémenté avec 0%, 4% et 6,5% de NaCl à pH 3 ; 6,5 et 9 après 24 à 72 heures.

b) Caractères biochimiques

Les caractères biochimiques étudiés sont le cytochrome oxydase et la catalase. La recherche du cytochrome oxydase a consisté à déposer un disque d'oxydase sur une lame et ajouter une petite quantité de la colonie à l'état frais sur le disque à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Après 30 secondes, le résultat est observé à l'œil nu. S'il y a apparition d'une coloration rouge qui vire aussitôt au violet ou noire, le microorganisme possède un cytochrome oxydase, dans le cas contraire il ne possède pas de cytochrome oxydase.

Pour le test de la catalase, une goutte d'eau oxygénée est déposée sur une lame et additionnée d'une petite quantité de la colonie à l'état frais à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, ensuite le résultat est observé à l'œil nu. S'il y a apparition de bulles alors le microorganisme produit une catalase dans le cas contraire, il est dit catalase négative.

2-4-1-5 Dénombrement des coliformes

(Norme AFNOR, NF ISO 4832 juillet 1991)

Le milieu utilisé pour le dénombrement des coliformes est la gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge. L'ensemencement se fait par incorporation de 1 mL de la suspension-mère ou des dilutions retenues dans des boîtes de Pétri stériles. Ensuite, il est coulé 12 à 15 mL du milieu en surfusion à 45°C dans les boîtes de Pétri contenant l'inoculum puis le mélange est homogénéisé par agitation douce. Après solidification, sur la première couche, il est coulé une deuxième couche de 4 à 5 mL du même milieu. L'incubation se fait à 30°C pour les coliformes totaux et 44°C pour les coliformes fécaux (*E. coli*). Les coliformes apparaissent rouges violacés, ronds d'un diamètre de 0,5 mm. Toutes les colonies présentes dans les boîtes de Pétri contenant 15 à 300 colonies sont dénombrées.

2-4-1-6 Dénombrement des Entérocoques

(Norme ISO 7899 /1)

La gélose BEA (Bile Esculine Azide) (AES Laboratoire, COMBOURG France) a été utilisée pour l'isolement des Streptocoques fécaux (Entérocoques). Ces microorganismes

hydrolysent l'esculine qui se matérialise par un halo noir d'esculine associée au fer autour des colonies. Sur le milieu solidifié en boîte de Pétri, 0.1 mL de la suspension-mère ou des dilutions retenues est déposé puis étalé à l'aide d'un râteau étaleur. Les boîtes de Pétri sont placées à l'étuve à 30°C pendant 24 à 48 heures pour l'incubation. Les colonies se présentent sous formes de points noirâtres. Toutes les colonies présentes dans les boîtes de Pétri contenant 30 à 300 colonies sont dénombrées.

2-4-1-7 Dénombrement des germes Anaérobies Sulfito-réducteurs

Les anaérobies sulfito-réducteurs ont été dénombrés par la méthode de Barbonnelle et *al.* (1987). Le dénombrement des Anaérobies Sulfito-réducteurs (formes végétatives et/ou spores) est une numération présomptive de *Clostridium perfringens*. Le milieu utilisé est la gélose tryptone sulfite à la néomycine (TSN) (BioMérieux, France). Pour l'ensemencement, 1 mL de la suspension-mère et/ou des dilutions décimales est prélevé puis ensemencé en double dans la masse de la gélose TSN préalablement fondue puis conservée en surfusion en tube à 45°C. Les tubes sont laissés au repos jusqu'à solidification complète des milieux. Les tubes sont ensuite incubés à l'étuve à 30°C. Une première lecture est effectuée après 24 heures pour prévenir le noircissement total du tube et une seconde après 48 heures où les grosses colonies noires dans le tube sont dénombrées.

2-4-1-8 Expression des résultats de la charge des microorganismes

Les résultats sont exprimés UFC/ml (Unité Formant Colonie par millilitre) et donnés par la relation suivante :

$$N \text{ (UFC/mL)} = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0.1n_2) d}$$

V : Volume de l'inoculum

n₁ : Nombre de boîtes de Pétri ou tubes ensemencés à la 1^{ère} dilution

n₂ : Nombre de boîtes ou tubes ensemencés à la 2^{ème} dilution

d : Dilution retenue

N : Nombre de colonies

UFC/mL : Unité Formant Colonie par millilitre

3- Fermentation des carbohydrates

Les souches de bactéries lactiques ont été identifiées selon le schéma discriminatoire de Wood et Holzapfel (1995). L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés selon les instructions du fabricant. La fermentation de diverses sources de carbone (profil fermentaire) a été réalisée sur les souches purifiées, à l'aide des galeries API 50 CHL (Biomérieux charbonnière, France). Chaque culture pure est cultivée pendant 24 h à 30°C dans le bouillon MRS. Les colonies pures sont prélevées à l'aide d'un écouvillon et introduites dans une ampoule de suspension medium (2 mL). La suspension est homogénéisée pour avoir une suspension dense de concentration 2 McFarland. Cette concentration est déterminée à l'aide d'un densimat (bio Merieux, France). L'inoculum obtenu est utilisé pour ensemeniser une seconde ampoule de suspension medium (5mL). Ainsi, la galerie inoculée est répartie dans des tubules. Cette galerie recouverte avec de l'huile de paraffine stérile est ensuite incubée à 30°C en aérobiose pendant 48h. Tous les tests sont lus à 24 h puis 48 h. Le pourpre de bromocrésol est pourpre en milieu basique ou neutre, et devient jaune lorsque le milieu est acide. En dégradant le lactose, les bactéries produisent de l'acide ce qui entraîne une acidification du milieu et donc le virage de l'indicateur coloré (le pourpre de bromocrésol) au jaune en milieu acide. Lorsque les bactéries n'utilisent pas le lactose mais les peptones, en dégradant les peptones les bactéries alcalinisent le milieu qui reste donc violet. Certaines bactéries lactiques réduisent l'esculine, qui se traduit par un virage du pourpre au noir. Le profil biochimique des différentes souches est obtenu grâce à un catalogue d'identification APILAB (bioMérieux, Marcy l'étoile, France).

4- Traitement des données et analyses statistiques

L'analyse de variance à un facteur (ANOVA) et le test de Duncan ont été effectués avec le logiciel STATISTICA, 99^{ème} Edition pour comparer les variables mesurées sur les différents vins de palme. Les différences sont considérées comme significatives pour des valeurs de $P < 0,05$. Ce logiciel a permis également de calculer les moyennes et les écarts types des paramètres analysés.

L'analyse en composantes principales (ACP) a servi à comparer les différents vins de palme récoltés à partir des variables mesurées. L'ACP permet de regrouper les variables mesurées en de nouvelles variables appelées « composantes » ou « facteurs ». Ce regroupement est basé sur la corrélation des variables. Le logiciel XLSTAT (Adinosoft Inc.) a été utilisé pour faire l'analyse en composantes principales. La rotation orthogonale des

composantes principales (Varimax) a permis d'obtenir une structure plus facile à analyser lorsqu'il y avait peu de variables indépendantes.

Les calculs et les figures ont été effectués à l'aide d'EXCEL 2003 (XP - Microsoft Corp.).

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I

Variations des propriétés microbiologiques et physicochimiques du vin de palme entre des productions successives durant l'exploitation de deux variétés de palmiers à huile (*Elaeis guineensis*)

1- Résultats

1-1 Variations des propriétés microbiologiques

A partir de chaque palmier, les sèves fraîchement récoltées tous les matins ont été l'objet de dénombrement des germes aérobies mésophiles (GAM), de bactéries lactiques, de levures, de coliformes et de germes anaérobies sulfite-réducteurs. Les prélèvements ont été réalisés par intervalles de trois (3) jours. Les microorganismes dans l'ensemble évoluent de façon similaire pour les deux variétés de palmiers utilisées. La charge en GAM reste élevée pendant toute la période d'exploitation. L'ensemble des résultats est consigné dans le tableau 9.

Tableau 9 : Microorganismes isolés des vins de palme fraîchement récoltés

		Différents jours d'exploitation									
Microorganismes	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	
<i>Dura</i>	GAM	8,7 ± 0,2 ^a	9,2 ± 0,2 ^a	8,6 ± 0,2 ^a	10,7 ± 0,3 ^a	9,4 ± 0,1 ^a	10,2 ± 0,3 ^a	9,7 ± 0,2 ^a	9,3 ± 0,1 ^a	8,7 ± 0,3 ^a	7,6 ± 0,2 ^a
	LAB	7,3 ± 0,2 ^a	7,6 ± 0,1 ^a	7,1 ± 0,2 ^a	7,8 ± 0,2 ^a	7,4 ± 0,3 ^a	7,7 ± 0,3 ^a	8,7 ± 0,2 ^a	7,4 ± 0,2 ^a	7,5 ± 0,2 ^a	7,3 ± 0,2 ^a
	Lev	3,5 ± 0,28 ^c	5,5 ± 0,15 ^c	6,4 ± 0,31 ^a	6,4 ± 0,2 ^a	7,1 ± 0,1 ^a	7,1 ± 0,2 ^a	7,1 ± 0,3 ^a	7,2 ± 0,2 ^a	7,5 ± 0,2 ^a	7 ± 0,2 ^a
	ENT	6,2 ± 0,1 ^a	5,7 ± 0,1 ^a	4,9 ± 0,1 ^b	5,9 ± 0,1 ^a	6,8 ± 0,1 ^a	6,4 ± 0,3 ^a	6,6 ± 0,2 ^a	7,2 ± 0,4 ^a	6,8 ± 0,3 ^a	7,7 ± 0,3 ^a
	CT	6,5 ± 0,1 ^a	7,3 ± 0,1 ^a	8,8 ± 0,3 ^b	7,2 ± 0,2 ^a	6,8 ± 0,3 ^a	6,4 ± 0,2 ^a	6,6 ± 0,1 ^a	6,8 ± 0,1 ^a	6,3 ± 0,2 ^a	6,2 ± 0,1 ^a
	CF	4,5 ± 0,2 ^c	4,8 ± 0,1 ^c	7,5 ± 0,2 ^a	5,8 ± 0,1 ^a	5,6 ± 0,2 ^a	5,9 ± 0,2 ^a	6,2 ± 0,3 ^a	6,8 ± 0,1 ^a	5,9 ± 0,2 ^a	6,1 ± 0,1 ^a
	ASR	1,3 ± 0,1 ^d	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GAM	10,2 ± 0,1 ^a	8,8 ± 0,3 ^a	9,7 ± 0,2 ^a	9,1 ± 0,2 ^a	8,9 ± 0,2 ^a	9,8 ± 0,3 ^a	10,1 ± 0,1 ^a	8,7 ± 0,2 ^a	9,5 ± 0,3 ^a
<i>Tenera</i>	LAB	8,6 ± 0,2 ^a	7,4 ± 0,3 ^a	6,9 ± 0,2 ^a	7,3 ± 0,1 ^a	7,1 ± 0,3 ^a	7,4 ± 0,2 ^a	8,4 ± 0,2 ^a	7,8 ± 0,3 ^a	7,4 ± 0,2 ^a	7,2 ± 0,3 ^a
	Lev	5,6 ± 0,3 ^a	6,1 ± 0,2 ^a	6,5 ± 0,2 ^a	6,9 ± 0,2 ^a	7,3 ± 0,3 ^a	7,1 ± 0,2 ^a	7,3 ± 0,2 ^a	7,3 ± 0,3 ^a	7,2 ± 0,2 ^a	7,2 ± 0,3 ^a
	ENT	7,5 ± 0,2 ^a	7,5 ± 0,2 ^a	6,1 ± 0,2 ^a	6,7 ± 0,1 ^a	6,4 ± 0,2 ^a	6,3 ± 0,2 ^a	6,9 ± 0,2 ^a	7,1 ± 0,2 ^a	7,6 ± 0,3 ^a	7,6 ± 0,2 ^a
	CT	7,5 ± 0,2 ^a	7,1 ± 0,3 ^a	8,1 ± 0,2 ^b	6,8 ± 0,2 ^a	7,1 ± 0,2 ^a	6,9 ± 0,3 ^a	7,1 ± 0,2 ^a	6,8 ± 0,3 ^a	6,8 ± 0,2 ^a	6,3 ± 0,2 ^a
	CF	5,9 ± 0,2 ^a	6,1 ± 0,2 ^a	7,1 ± 0,1 ^a	6,1 ± 0,2 ^a	6,6 ± 0,1 ^a	6,4 ± 0,1 ^a	5,9 ± 0,1 ^a	5,9 ± 0,1 ^a	5,5 ± 0,2 ^a	5,8 ± 0,2 ^a
	ASR	1,58±0,09 ^d	0	0	0	0	0	0	0	0	0

GAM : germes aérobies mésophiles ; LAB : bactéries lactiques ; Lev : levures ; ENT : Entérocoques ; CT : coliformes totaux ; CF : coliformes fécaux ; ASR : germes anaérobies sulfite-réducteurs

1-1-1 Charge en germes aérobies mésophiles, bactéries lactiques, Entérocoques et levures.

La charge en germes aérobies mésophiles (GAM) du vin de palme fraîchement récolté varie en dents de scie d'une production à une autre. Les premières récoltes de vin de palme (jour 1) à partir des variétés de palmier à huile présentent les charges en GAM les plus élevées ($\log 10,2 \pm 0,1$ UFC/mL) dans le vin de la variété *Tenera* par rapport à celui de la variété *Dura* ($\log 8,7 \pm 0,2$ UFC/mL). A la quatrième production (jour 4) à partir des mêmes pieds de palmier, les charges en GAM observées dans les vins fraîchement récoltés sont de $\log 9,2 \pm 0,2$ UFC/mL pour le vin issu de la variété *Dura* et de $\log 8,3 \pm 0,3$ UFC/mL pour ceux provenant de la variété *Tenera*. Du 10^{ème} au 16^{ème} jour d'exploitation des palmiers, ce sont les vins produits de la variété *Dura* qui présentent les charges en GAM les plus élevées. Pendant que l'on observe une légère diminution des GAM dans les vins de la variété *Dura* à partir du 16^{ème} jour, les charges en GAM dans les vins de la variété *Tenera* ne varie pas de façon significative. Après 28 jours d'exploitation la charge en GAM est de $\log 7,6 \pm 0,2$ UFC/mL dans le vin de la variété *Dura* alors qu'elle reste élevée ($\log 8,9 \pm 0,2$ UFC/mL) dans celui de la variété *Tenera* (Figure 9a). L'analyse statistique des données n'a relevé aucune différence significative ($p \geq 0,05$) de la charge en GAM des différents vins produits pendant 28 jours d'exploitations des deux variétés de palmiers.

La charge en bactéries lactiques du vin de palme fraîchement récolté varie d'une production à une autre. Durant toute la durée d'exploitation des palmiers, trois (3) phases de variation ont été observées. Pendant la première semaine, la charge en bactéries lactiques dans le vin diminue d'une production à la suivante. Ainsi, les premiers vins fraîchement récoltés contiennent les charges les plus élevées en bactéries lactiques. Les valeurs observées sont de $\log 7,3 \pm 0,2$ UFC/mL et $\log 8,6 \pm 0,2$ UFC/mL respectivement dans les vins issus de la variété *Dura* et *Tenera*. A la 7^{ème} production, les charges enregistrées ne sont que de $\log 7 \pm 0,2$ UFC/mL pour la variété *Dura* et de $\log 7,1 \pm 0,2$ UFC/mL pour la variété *Tenera*. La deuxième phase est marquée par une augmentation de la charge en bactérie lactique à chaque production. La charge la plus élevée est observée dans les vins produits au 19^{ème} jour ($\log 8,7 \pm 0,2$ UFC/mL pour la variété *Dura* et $\log 8,4 \pm 0,2$ UFC/mL pour la variété *Tenera*). Les charges en bactéries lactiques dans les vins produits pendant la troisième phase sont plus faibles que celles observées précédemment. Au 28^{ème} jour d'exploitation des palmiers, les charges sont $\log 7,3 \pm 0,2$ UFC/mL et $\log 7,2 \pm 0,3$ UFC/mL respectivement pour la variété *Dura* et *Tenera* (Figure 9b). L'analyse statistique des données n'a relevé aucune différence significative ($p \geq 0,05$) de la charge en bactéries lactiques.

Quant aux Entérocoques, deux phases sont observées au niveau des variations des charges pendant l'exploitation des palmiers. La première semaine est caractérisée par une diminution des Entérocoques d'une production à une autre, et pendant la deuxième phase, qui part du 7^{ème} jour jusqu'au 28^{ème} jour, la charge en Entérocoques est croissante. Les charges enregistrées à la première production sont $\log 6,2 \pm 0,1$ UFC/mL pour la variété *Dura* et $\log 7,5 \pm 0,2$ UFC/mL pour celle de *Tenera*. Au 7^{ème} jour, les charges des vins frais baissent jusqu'à $\log 4,9 \pm 0,1$ UFC/mL et $\log 6,1 \pm 0,2$ UFC/mL respectivement pour la variété *Dura* et *Tenera* puis croissent jusqu'à $\log 7,7 \pm 0,2$ UFC/mL et $\log 7,6 \pm 0,2$ UFC/mL dans les vins du 28^{ème} jour d'exploitation des palmiers (Figure 9c). Les vins de palme de la 4^{ème} production et ceux de la 7^{ème} de la variété *Tenera* présentent des écarts significatifs de charges.

Du début au 28^{ème} jour d'exploitation des palmiers, la charge en levures d'un vin est de façon générale supérieure à celle de la production précédente. Les charges enregistrées dans les vins des deux variétés donnent des courbes moyennes d'allure parabolique. Les charges en levures des vins produits le premier jour d'exploitation sont de $\log 3,5 \pm 0,3$ UFC/mL dans le vin de la variété *Dura* et $\log 5,6 \pm 0,3$ UFC/mL pour la variété *Tenera*. Les vins de la 28^{ème} production ont des charges de $\log 7 \pm 0,2$ UFC/mL pour la variété *Dura* et $\log 7,2 \pm 0,3$ UFC/mL pour celle de *Tenera* (Figure 9d). L'analyse statistique des données n'a relevée aucune différence significative ($p \geq 0,05$) de la charge en levures après le 4^{ème} jour d'exploitation.

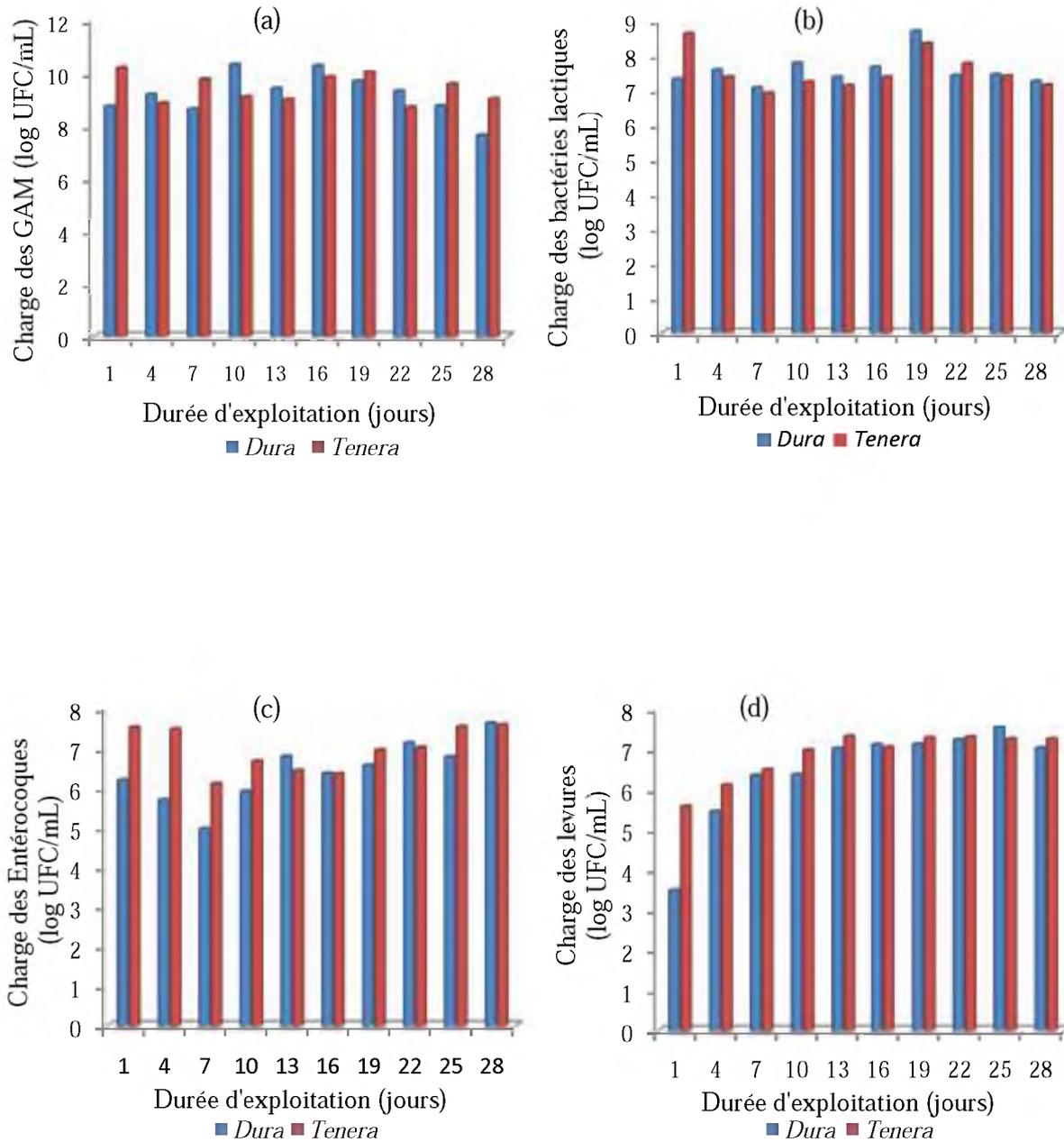


Figure 9 : Evolution de la charge en GAM (a), bactéries lactiques (b), Entérocoques (c) et en levures (d) des vins de palme extraits de palmiers à huile des variétés *Dura* et *Tenera* au cours de l'exploitation

1-1-2 Charge en coliformes et germes anaérobies sulfito-réducteurs

Les charges en coliformes (totaux et fécaux) dans les différents vins produits à partir des deux variétés de palmiers varient de façon irrégulière. La charge en coliformes totaux ou coliformes fécaux d'une production de vin peut être inférieure ou supérieure à la production précédente. Toutefois les écarts sont plus marqués entre les vins produits pendant les deux premières semaines de production. En effet, pendant la première semaine, la charge en coliformes totaux dans le vin augmente d'une production à la suivante. Ainsi, les valeurs observées sont $\log 6,5 \pm 0,1$ UFC/mL et $\log 7,5 \pm 0,2$ UFC/mL respectivement dans les vins issus de la variété *Dura* et *Tenera*. A la 7^{ème} production, les charges enregistrées sont de $\log 8,7 \pm 0,2$ UFC/mL et pour la variété *Dura* et de $\log 8,1 \pm 0,2$ UFC/mL pour la variété *Tenera*. Dans le vin de palme fraîchement récolté le 19^{ème} jour de production, la charge en coliformes totaux est de $\log 6,6 \pm 0,2$ UFC/mL dans les vins issus de la variété *Dura* et de $\log 7,1 \pm 0,2$ UFC/mL dans ceux issus de la variété *Tenera* mais à la 22^{ème} production la différence de charge en coliformes totaux dans les vins de palme issus des deux variétés de palmiers n'est pas significative ($P \geq 0,05$) (Figure 10a). Les résultats des traitements statistiques présentent des différences significatives au niveau des productions de la même variété mais ces résultats ne présentent pas de différences significatives entre les deux variétés.

Les germes anaérobies sulfito-réducteurs dans les vins du premier jour d'exploitation sont de $\log 1,3 \pm 0,1$ UFC/mL dans le vin de variété *Dura* et de $\log 1,6 \pm 0,2$ UFC/mL dans celui de *Tenera*. Les anaérobies sulfito-réducteurs ne sont plus détectés dans les productions suivantes à partir du 4^{ème} jour d'exploitation des palmiers (Figure 10c).

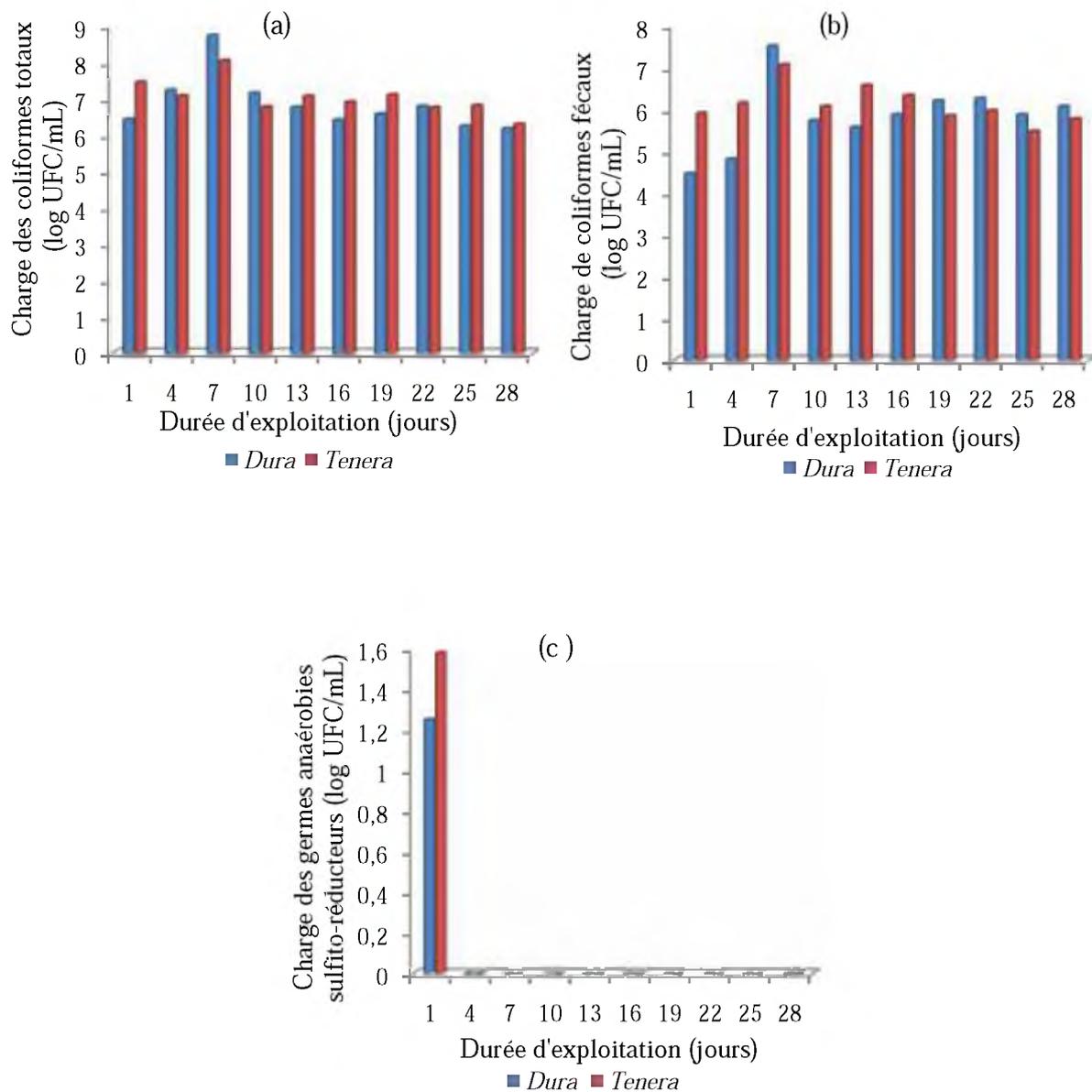


Figure 10 : Evolution des charges en coliformes totaux (a), coliformes fécaux (b) et en germes sulfito-réducteurs (c) des vins de palme extraits de palmiers à huile des variétés *Dura* et *Tenera* au cours de l'exploitation.

1-2 Variation des propriétés physicochimiques

1-2-1 Viscosité

La figure 11 présente les variations des viscosités des vins de palme extraits des palmiers de variété *Dura* et *Tenera*. Du 1^{er} au 13^{ème} jour d'exploitation la viscosité du vin frais issu du palmier *Dura* est nettement supérieure à celle du vin tiré du palmier *Tenera*. La viscosité est de $8,28 \pm 0,3$ cP dès le premier jour d'exploitation et de $5,53 \pm 0,2$ cP à la 4^{ème} production dans le vin à partir de la variété *Dura*. Les valeurs observées dans le vin de la variété *Tenera* sont de 2,61 cP le premier jour et de 1,27cP après 13 jours d'exploitation. A partir du 13^{ème} jour d'exploitation, les écarts de viscosités ne sont plus significatifs entre deux productions successives dans le vin de la variété *Dura*. De même, les écarts entre les productions successives dans le vin de la variété *Tenera* ne sont pas significatifs à partir du 4^{ème} jour d'exploitation.

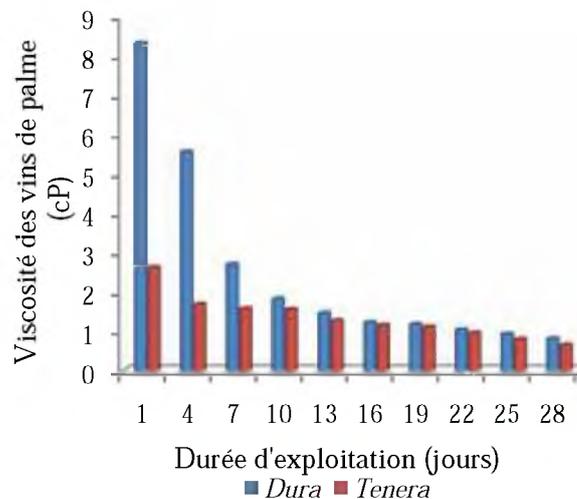


Figure 11 : Evolution de la viscosité des vins de palme frais extraits de palmiers à huile des variétés *Dura* et *Tenera* au cours de l'exploitation.

1-2-2 pH et acidité titrable

Pendant la première semaine d'exploitation du palmier *Dura*, le pH d'un vin frais récolté est nettement plus faible que celui de la production précédente. Le pH est de $5,23 \pm 0,28$ dès le premier jour d'exploitation et de $4,4 \pm 0,12$ à la 4^{ème} production. A partir du 7^{ème} jour de production, les écarts de pH observés entre deux productions successives ne sont plus significatifs au seuil de 5%. Le pH du vin produit au 28^{ème} jour d'exploitation est de $4,43 \pm 0,14$ dans le vin de palme *Tenera*.

En début d'exploitation des palmiers, le pH du vin de la variété *Tenera* est plus faible que celui de la variété *Dura*. Le pH du vin de palme issu du palmier *Tenera* demeure constant tout au long de l'exploitation jusqu'au 28^{ème} jour alors que celui de la variété *Dura* diminue pour atteindre la valeur minimale de $4,4 \pm 0,12$ au 4^{ème} jour (figure 12a).

L'acidité titrable du vin de palme de la variété *Dura* est constamment supérieur à celle du vin issu du palmier *Tenera*. Les acidités titrables quant à elles augmentent successivement d'une production à une autre au cours de l'exploitation des palmiers. Dès le premier jour d'exploitation des palmiers, l'acidité titrable est de $0,17 \pm 0,02\%$ dans le vin de la variété *Dura* et de $0,27 \pm 0,01\%$ dans celui de la variété *Tenera*. Au 28^{ème} jour d'exploitation des palmiers, l'acidité titrable est de $0,5 \pm 0,04\%$ dans le vin de palme issu de la variété *Tenera* et de $0,88 \pm 0,09\%$ dans celui de la variété *Dura* (figure 12b).

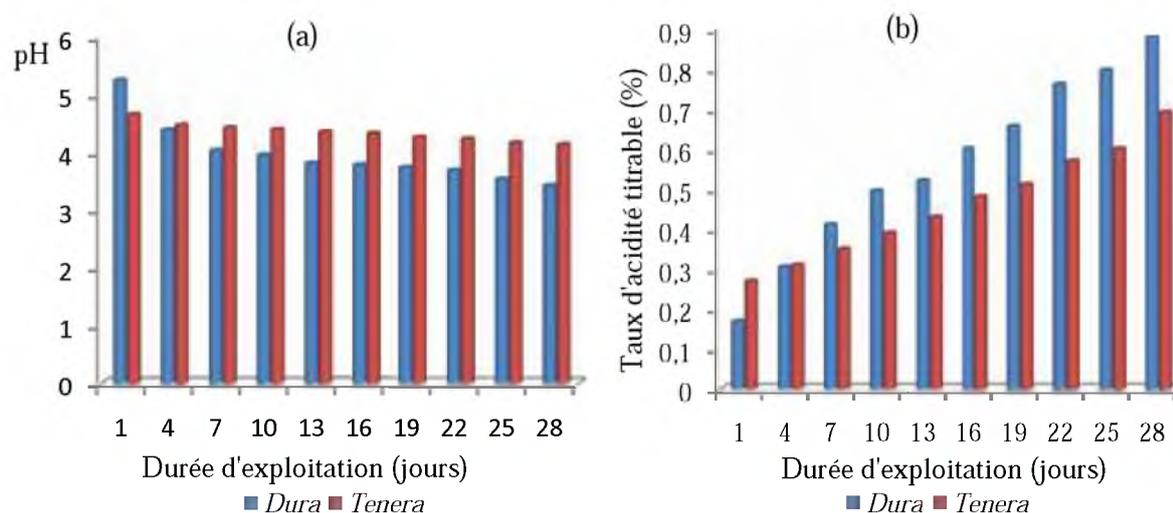


Figure 12 : Evolution du pH (a) et de l'acidité titrable (b) des vins de palme extraits de palmiers à huile des variétés *Dura* et *Tenera* au cours de l'exploitation.

1-2-3 Teneurs en sucres et en éthanol

La teneur en sucres totaux des vins produits des palmiers *Tenera* sont faibles que celle du palmier *Dura*. La teneur en sucres totaux des vins du palmier *Dura* produits pendant les deux premières semaines d'exploitation des palmiers est plus élevée que celle des vins récoltés pendant les 3^{ème} et 4^{ème} semaines. De plus, les écarts des teneurs en sucres totaux entre deux productions successives sont plus importants au cours des deux semaines d'exploitation. En effet, la teneur en sucres totaux des vins de la première production du palmier *Dura* est de $501,68 \pm 22,6$ g/L et celle du 4^{ème} jour est de $373,73 \pm 37,5$ g/L.

Pour les vins produits à partir du palmier *Tenera*, les variations ont été observées à partir de la 7^{ème} production et les écarts observés entre les productions successives sont faibles. La teneur en sucres totaux du vin produit du 1^{er} au 7^{ème} jour d'exploitation est en moyenne de 200 g/L par production ; celles du 13^{ème} et 14^{ème} jour d'exploitation sont respectivement de $98 \pm 13,4$ g/L et $75,33 \pm 10,2$ g/L (figure13a).

Les teneurs en sucres réducteurs varient dans les mêmes ordres que celles des sucres totaux mais avec des différences significatives. Ainsi, à partir de la 7^{ème} production, les différences entre les vins produits des palmiers *Dura* et *Tenera* ne sont plus significatives. La teneur en sucres réducteurs des vins produits le 10^{ème} jour sont de $19,16 \pm 4$ g/L pour le vin de la variété *Dura* et de $20,78 \pm 9,2$ g/L pour le vin de la variété *Tenera*. Les teneurs en sucres réducteurs des vins du 19^{ème} jour d'exploitation sont respectivement de $16,23 \pm 5$ g/L pour le vin issu de la variété *Dura* et de $16,8 \pm 4$ g/L pour le vin de la variété *Tenera* (figure 13b).

Le taux d'éthanol dans le vin de palme fraîchement récolté est supérieur à celui de la récolte précédente quelque soit la variété du palmier. Pour toutes les productions, du 1^{er} au 22^{ème} jour d'exploitation, la teneur en éthanol du vin du palmier *Tenera* est supérieure à celle de la variété *Dura*. Les valeurs enregistrées au 10^{ème} et 22^{ème} jour d'exploitation sont de $1,63 \pm 0,1\%$ et de $2,26 \pm 0,1\%$ pour les vins produits à partir du palmier *Tenera*. Les teneurs enregistrées au 10^{ème} et 22^{ème} jour sont de $1,22 \pm 0,05\%$ et de $1,68 \pm 0,04\%$ pour le vin de la variété *Dura*. A partir du 22^{ème} jour d'exploitation, l'écart entre les teneurs en éthanol de deux productions successives du vin de palmier devient élevé. Le taux d'éthanol varie de $1,68 \pm 0,1\%$ dans les vins du 22^{ème} jour d'exploitation à $3,18 \pm 0,06\%$ dans ceux du 28^{ème} jour d'exploitation de la variété *Dura* (figure 13c). Cependant les taux d'éthanol produits entre le 4^{ème} et le 7^{ème} jour d'exploitation sont semblables pour les deux (2) variétés de palmier. Entre le 10^{ème} et le 22^{ème} jour, l'éthanol mesuré dans le vin issu du palmier *Tenera*

est nettement supérieur à celui obtenu à partir du palmier *Dura*. Ce n'est qu'à partir du 25^{ème} jour que l'éthanol dosé dans le vin *Dura* devient supérieur à celui du vin *Tenera*.

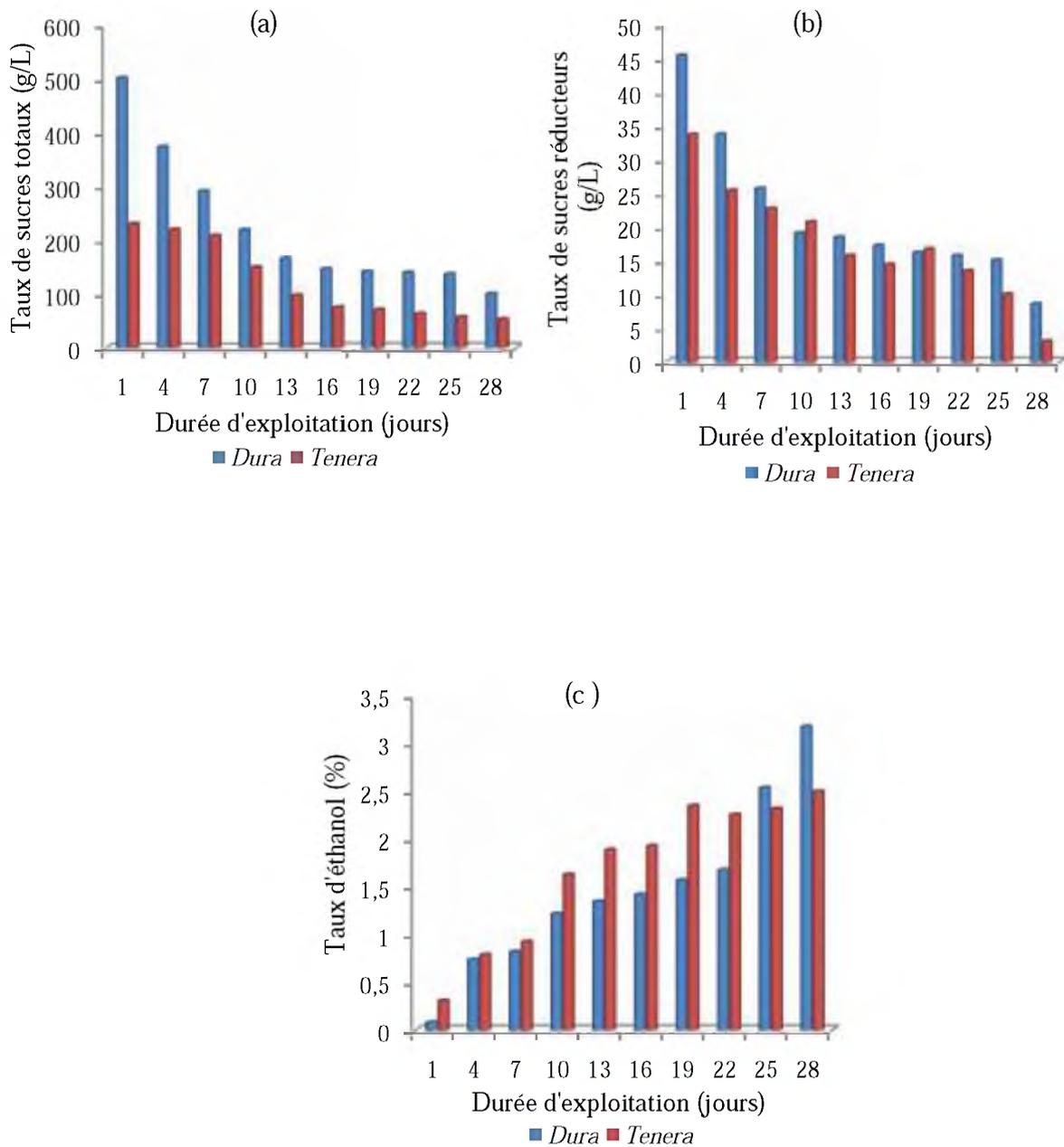
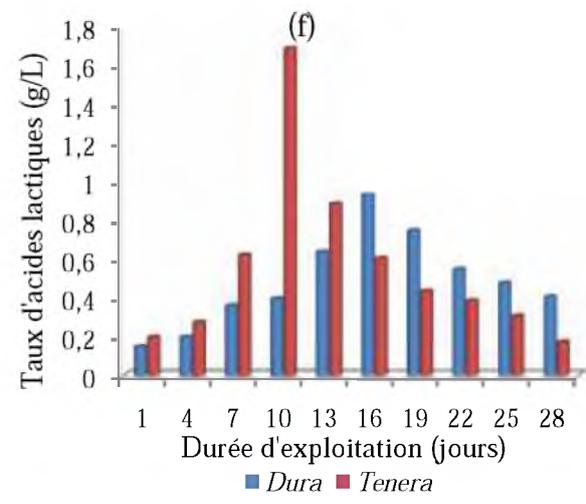
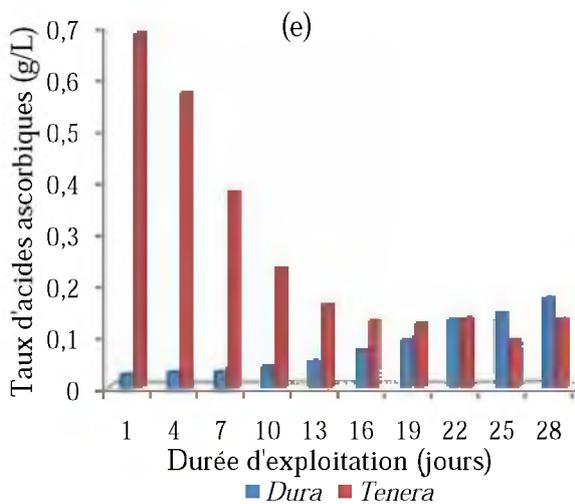
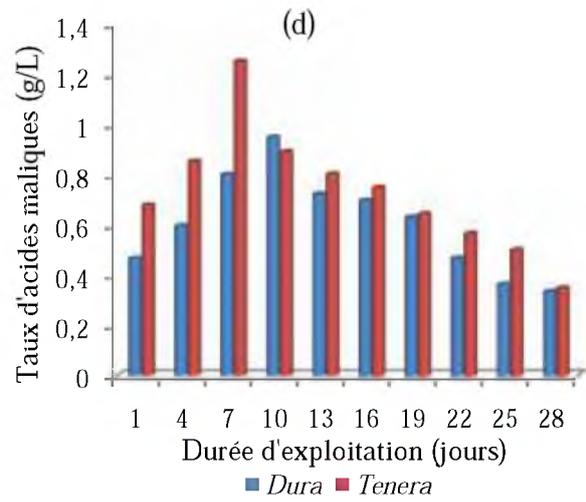
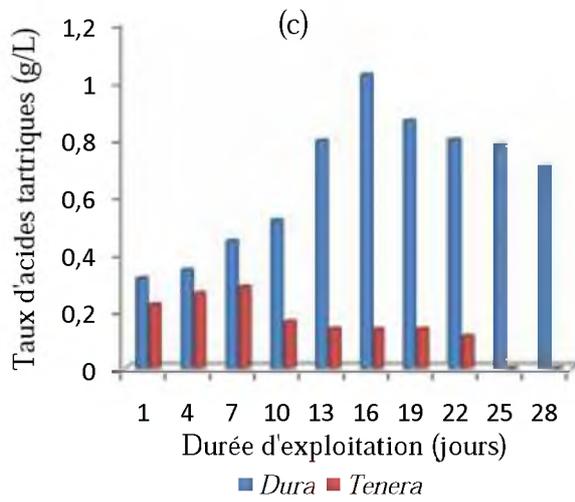
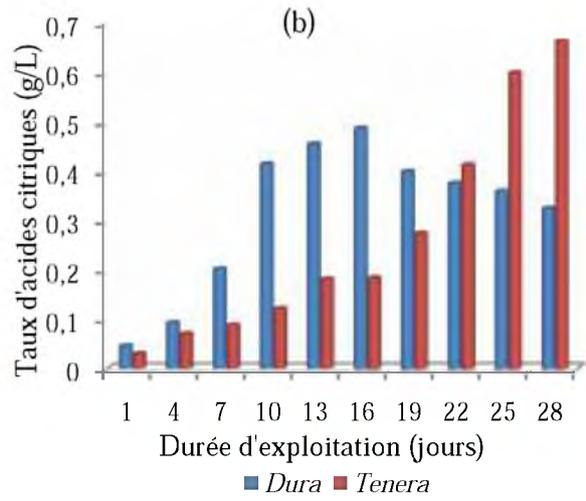
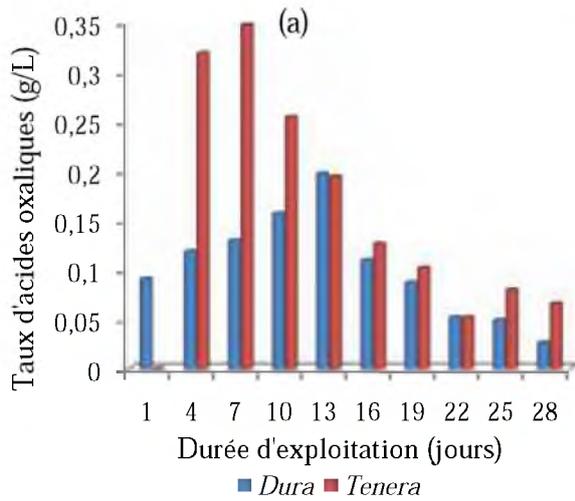


Figure 13 : Evolution des teneurs en sucres totaux (a), sucres réducteurs (b) et du taux d'éthanol (c) des vins de palme extraits de palmiers à huile des variétés *Dura* et *Tenera* au cours de l'exploitation.

1-2-4 Acides organiques

L'évolution des acides organiques détectés dans les vins de palme pendant l'exploitation du vin de palme est présentée à la figure 14. Les acides organiques détectés dans le vin de palme collecté de la variété *Dura*, le premier jour d'exploitation sont les acides oxalique ($0,1 \pm 0,01$ g/L), citrique ($0,05 \pm 0,02$ g/L), tartrique ($0,31 \pm 0,04$ g/L), malique ($0,5 \pm 0,02$ g/L), ascorbique ($0,05 \pm 0,002$ g/L), fumarique ($0,01 \pm 0,0005$ g/L), lactique ($0,15 \pm 0,02$ g/L) et acétique ($0,1 \pm 0,02$ g/L). L'acide propionique n'a été détecté que dans le vin produit au 10^{ème} jour d'exploitation. Les vins de la variété *Tenera* ont été exempts d'acide propionique pendant toute la durée d'exploitation. La teneur en acides organiques, à l'exception des acides ascorbiques et des acides fumariques, des différentes productions de vin augmente d'une production à la suivante au cours temps. Les écarts des teneurs varient à la fois en fonctions de la teneur en acide organique et de la variété de palmier. Ainsi, la teneur en acide oxalique dans le vin de la 7^{ème} production est de $0,35 \pm 0,02$ g/L pour le vin de la variété *Tenera*. Durant toute la durée de l'exploitation des palmiers, deux (2) phases de variation ont été observées. Pendant les deux premières semaines, le taux d'acides organiques dans le vin augmente d'une production à la suivante. La deuxième phase est marquée par une diminution du taux d'acide organique à chaque production successive. Les valeurs maximales observées sont de $0,35 \pm 0,02$ g/L le 7^{ème} jour (acide oxalique), $1,26 \pm 0,07$ g/L le 7^{ème} jour (acide malique) et de $1,68 \pm 0,06$ g/L le 10^{ème} jour (acide lactique) pour le vin de la variété *Tenera*. Les valeurs maximales observées sont de $0,48 \pm 0,02$ g/L au 16^{ème} jour (acide citrique), $1,02 \pm 0,04$ g/L le 16^{ème} jour (acide tartrique) pour le vin issu de la variété *Dura*.



Suite de la figure 14

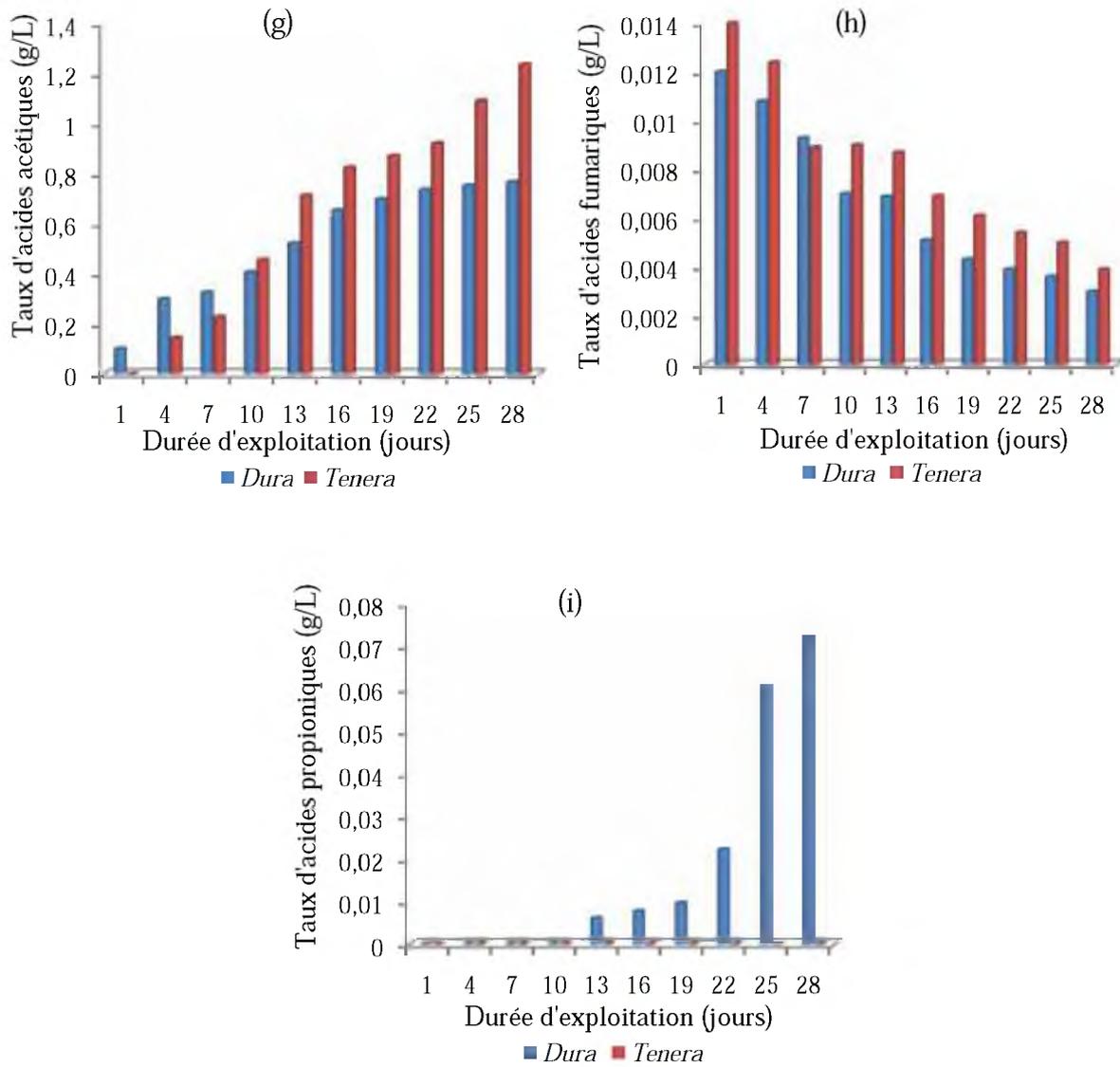


Figure 14 : Evolution des acides organiques des vins de palme extraits de palmiers à huile des variétés *Dura* et *Tenera* au cours de l'exploitation. (a) : acide oxalique, (b) : acide citrique, (c) : acide tartrique, (d) : acide malique, (e) : acide ascorbique, (f) : acide lactique, (g) : acide acétique, (h) : acide fumarique, (i) : acide propionique.

1-2-5 Analyse en Composantes Principales (ACP) des caractéristiques des vins de palme

Afin de simplifier l'interprétation des données et déterminer l'emplacement pour les différents vins de chaque variété de palmier, l'Analyse en Composantes Principales (ACP) de la matrice de coefficients de corrélation a été utilisée. Les deux composantes principales permettent d'expliquer 82,20% de la variation des données, avec la première composante (PC1) représentant plus de 57,33% de la variation et la seconde composante (PC2), qui représente 24,87% de la variation pour la variété *Dura*. Pour la variété *Tenera*, les deux composantes principales permettent d'expliquer 76,26% de la variation des données, avec la première composante (PC1) représentant plus de 60,15% de la variation et la seconde composante (PC2), qui représente 16,11% de la variation.

La figure 15a présente les caractéristiques microbiennes, chimiques et des vins de palme pour la variété *Dura*. A une exception près, la plupart des caractéristiques d'acidité sont représentées près de l'axe F2 (acides lactique, citrique, tartrique, acétique et l'acidité titrable totale). Les acides malique et oxalique sont représentés très loin des autres. Sur l'axe F2, l'acide fumarique, le pH, les sucres (totaux et réducteurs) et la matière sèche sont présentés à l'opposé des acidités. L'analyse des différents vins de palme a permis de donner leur position. Ainsi, le vin de palme V0 a été identifié sur l'axe F2, à l'opposé des vins V3 et V4. Les deux vins de palme sont également opposés aux vins V1 et V2 sur l'axe F1. Le vin de palme V0 est caractérisé par des teneurs en matières sèches, sucres totaux, sucres réducteurs, en acide fumarique et le pH, tandis que les vins V1 et V2 sont caractérisés par leurs teneurs élevées en acides malique et oxalique et leurs charges élevées en germes aérobies mésophiles (GAM) et coliformes. Les Entérocoques sont les caractéristiques des vins V4 alors que l'acide lactique, citrique, tartrique, les levures, l'acide acétique et l'éthanol sont les caractéristiques liées à la fois aux vins V2 et V3.

La figure 15b présente les caractéristiques microbiennes, chimiques et des vins de palme pour la variété *Tenera*. Les acides étudiés sont diversement représentés sur la figure. Sur l'axe F2, les sucres, le pH et les matières sèches se présentent à l'opposé des autres paramètres. L'analyse des différents vins de palme a permis de donner leur position. Le vin de palme V0 est représenté sur l'axe F1, à l'opposé des vins V3 et V4. Ces deux derniers sont également opposés au vin V2. Le vin V1 est caractérisé par les teneurs en matières sèches, sucres totaux, sucres réducteurs, le pH et les charges en coliformes fécaux alors que les vins V3 et V4 sont caractérisés par le taux d'éthanol, les teneurs en acidité titrable, en acides acétique, malique, fumarique, tartrique, citrique, lactique et la charge élevée en bactéries

lactiques, Entérocoques et levures. Les teneurs en acides ascorbique et oxalique sont les caractéristiques liées au vin V2.

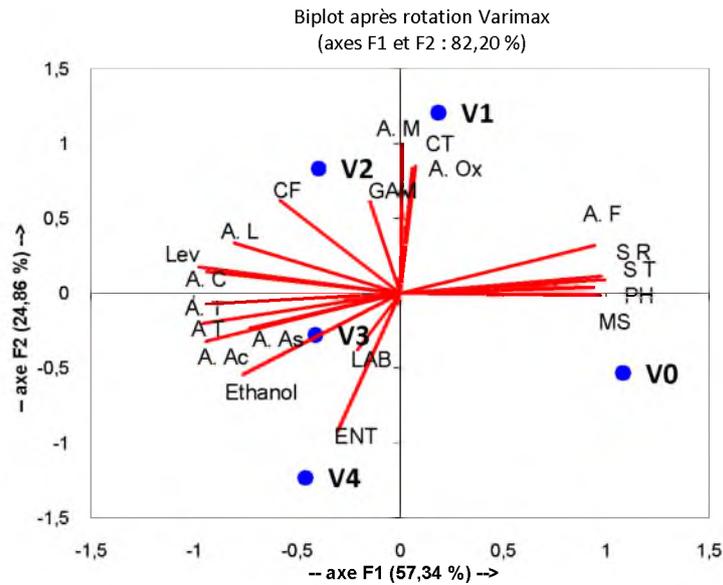


Figure 15a : Analyse en composantes principales pour la variété *Dura*

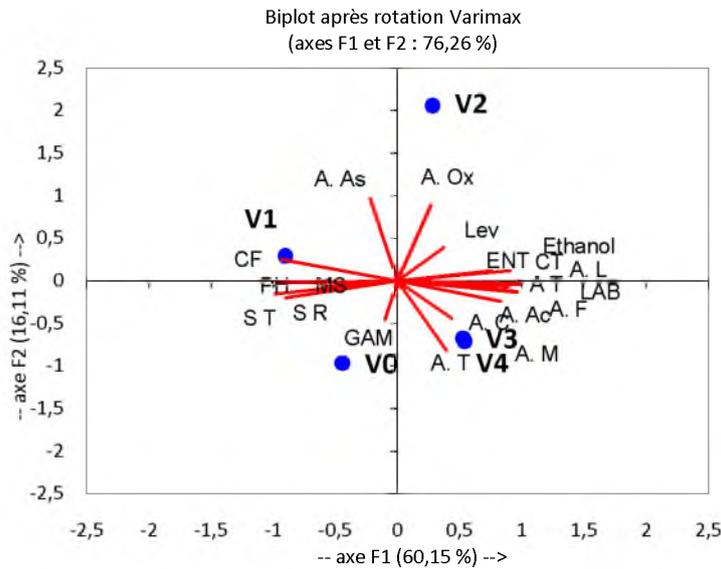


Figure 15b : Analyse en composantes principales pour la variété *Tenera*

Figure 15: Analyse en composantes principales (ACP) des caractéristiques microbiennes et biochimiques des vins de palme des deux variétés de palmiers. V0: sève du premier jour; V1: sève de la première semaine; V2: sève de la deuxième semaine; V3: sève de la troisième semaine; V4: sève de la quatrième semaine. GAM: germes aérobies mésophiles; MS: matières sèches; ENT: Entérocoques; CF: coliformes fécaux; LAB: bactéries lactiques; Lev : levures ; SR: sucres réducteurs; CT: coliformes totaux; ST: sucres totaux; AT: acidité titrable; A.Ox : acide oxalique ; A.F : acide fumarique ; A.L : acide lactique ; A.C : acide citrique ; A.T : acide tartrique ; A.Ac : acide acétique ; A.M : acide malique ; A.As : acide ascorbique .

2-Discussion

Pendant la production du vin de palme, la sève du palmier est récoltée par gouttes dans des récipients qui servent de fermenteurs. La quantité de sève récoltée par palmier pendant environ 12 heures (matin et soir), constitue le vin frais de palmier du jour. L'exploitation d'un palmier dure pendant 3 à 4 semaines selon l'état physiologique du palmier et la méthode d'exploitation. L'analyse des paramètres microbiologiques et physicochimiques des productions journalières de vin de palme selon la méthode du palmier abattu, a permis de déterminer les variations des caractéristiques d'une récolte à une autre. La charge globale des microorganismes reste élevée pendant l'exploitation des palmiers et la charge fluctue entre $\log 7,6 \pm 0,2$ et $\log 10,3 \pm 0,2$ UFC/mL. De même pour la charge en bactéries lactiques fluctue entre $\log 7,2 \pm 0,3$ et $\log 8,6 \pm 0,2$ UFC/mL. La charge en levures augmente pendant l'exploitation des palmiers et reste presque stable jusqu'à la fin de l'exploitation après le 13^{ième}.

Les compétitions entre les microorganismes dans ce milieu complexe déterminent la charge des GAM et des autres microorganismes dans la production suivante. Les microorganismes dans le vin de palme frais pourraient provenir de ceux qui colonisent les différentes parties du palmier à huile qui sont entre autres les inflorescences mâles, le pétiole de la feuille, le feutre utilisé, les bandes transversales et du xylème qui sont couverts de poils duveteux en croissances. Certains d'entre eux sont également apportés par le récolteur, les matériels d'exploitation et les insectes attirés par les taux de sucres élevés de la sève. Ces résultats d'exploitation sont similaires à ceux de Faparusi (1973), selon lui les GAM présents dans le vin de palme sont apportés par le matériel utilisé par le récolteur ainsi que les insectés présents dans le vin de palme. Pendant la première semaine la compétition entre les microorganismes, au cours des productions successives est en défaveur des Entérocoques, des coliformes (totaux et fécaux) et des germes anaérobies sulfito-réducteurs. La deuxième semaine est marquée par une diminution des coliformes au profit des Entérocoques. Elle est marquée aussi par une diminution du pH et une augmentation de l'éthanol dans les vins de palme. La diminution du pH et l'augmentation de l'éthanol permettent une acidification du vin de palme assurée par les bactéries lactiques dont les charges varient très peu pendant ces fermentations de type semi-continues. En effet, les microorganismes telles que les bactéries lactiques produisent des acides organiques notamment l'acide lactique qui permettent l'augmentation de l'acidité titrable et donc la baisse du pH. Normalement, la sève du palmier a un pH approximativement neutre d'après les travaux réalisés par Jitbunjerdkul (1989) et

Lasekan et al. (2007). Par conséquent, l'acidité titrable élevée et le bas pH du vin obtenu indiquent qu'une fermentation initiale de la sève du palmier est réalisée avant la collecte de la sève fraîche le matin. Aussi les résultats du pH, d'acidité titrable et de l'acide lactique confirment la présence importante des bactéries lactiques dans le vin de palme. Ces résultats similaires à ceux de Amoa-Awua et al. (2007), confirment que, les bactéries lactiques sont responsables de l'acidification rapide des aliments de même que les bactéries acétiques dont la présence n'a pu être mise en évidence pendant l'exploitation du vin de palme. La diminution du taux de sucres au cours de l'exploitation indique clairement qu'une partie des sucres a été fermentée au cours de l'exploitation du vin de palme extrait des palmiers. En outre, la diminution rapide du taux de sucres pourrait s'expliquer par une transformation en alcool et autres produits. L'augmentation de l'acidité indique une production d'acide dans le vin de palme comme l'avaient préalablement indiqué les travaux d'Olasupo et Obayori (2003) et ceux d'Obire (2005).

Les levures très peu affectées par l'acidification sont à l'origine de l'augmentation du taux d'éthanol dans le vin. En effet, les charges en levures augmentent progressivement en une figure parabolique au cours de l'exploitation des palmiers. Les différents paramètres physicochimiques observés dans les vins de palme extrait des palmiers de variétés *Dura* et *Tenera* pourraient favoriser l'évolution de la charge en levures. De plus, la forte augmentation de la charge des levures pourrait être liée à la composition physicochimique du vin de palme (Nwachukwu et al., 2006). L'augmentation de la charge en levures dans les vins de palme entraîne l'augmentation du taux d'éthanol observé dans les vins de palme après le 10^{ème} jour d'exploitation. Le faible taux d'éthanol observé dans le vin de palme collecté les premiers jours de l'exploitation dépend de plusieurs facteurs notamment le rapport nature du substrat/système de fermentation. Les sèves collectées le 28^{ème} jour d'exploitation ont un taux élevé d'éthanol. Ce fort taux d'éthanol pourrait être dû non seulement aux levures mais aussi aux bactéries lactiques qui produisent des taux d'éthanol à partir des acides organiques présents dans le vin de palme. Selon Lindsay (1996), les bactéries lactiques produisent aussi de faibles taux d'éthanol et utilisent le pyruvate comme le principal récepteur d'hydrogène final.

Une forte population de coliformes et des anaérobies sulfite-réducteurs a été identifiée dans les différents vins de palme en début d'exploitation avec des charges plus élevées dans le vin de palme extrait de la variété *Tenera* par rapport au vin de palme de la variété *Dura*. La présence de coliformes dans les vins de palme pourrait s'expliquer par une contamination fécale humaine ou animale sur le lieu de l'exploitation, ainsi que par la présence d'insectes

attirés par les sucres contenus dans les vins de palme comme l'avait observé Tchiendji (1985). En outre, la présence de coliformes et des germes anaérobies sulfite-réducteurs se présente comme des preuves de mauvaises conditions d'hygiène lors de la collecte du vin de palme. Ces microorganismes peuvent être des contaminants provenant du récipient non traité et utilisé de suite pour l'exploitation du vin de palme par les récolteurs (Murray, 1990). Par ailleurs, la variation de la composition microbiologique et biochimique du starter associée à la modification biochimique de la sève, conduisent à une variation des propriétés physico-chimiques du vin fraîchement récolté.

La viscosité du vin de palme extrait du palmier à huile de variété *Dura* est plus élevée (8,28 cP) dès le premier jour d'exploitation contrairement à celle du vin de palme de la variété *Tenera* où elle est de 2,61 cP. Cependant, la viscosité pour chaque variété de palmier est plus élevée que celle obtenue par Osuwa et *al.* (2008) qui a trouvé 1 cP pour les vins de palme récoltés dès le premier jour. Pendant l'exploitation, la diminution rapide de la viscosité est observée dans le vin de palme de la variété *Dura* dans les treize (13) premiers jours. Mais au delà des treize (13) premiers jours de production, les viscosités ne présentent plus de différences significatives jusqu'à la fin de l'exploitation. La diminution de la viscosité serait due à la présence des microorganismes laissés dans le récipient de collecte qui dégradent les sucres contenus dans le vin de palme ; ce qui permet la diminution de la viscosité. Les résultats obtenus ne correspondent pas avec ceux obtenus par Osuwa et *al.* (2008) qui indiquent que la diminution de la viscosité se produit pendant les trois (3) premiers jours d'exploitation du vin de palme.

Le vin de palme extrait de la variété *Dura* le premier jour d'exploitation contient un taux élevé de sucres totaux mais contient une faible concentration en éthanol. Le taux de sucres totaux en début d'exploitation du vin de palme est de $501,68 \pm 26$ g/L. Mais ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par Odunfa (1985) et ceux d'Olasupo et Obayori (2003) qui ont démontré que le taux de sucres totaux dans le vin de palme frais est de 10-12%. Des différences significatives observées au niveau des variations des taux de sucres totaux sont probablement dues aux différentes variétés de palmiers mais aussi aux différentes charges microbiennes obtenues dans les vins de palme. Le pH, les taux de sucres réducteurs et d'éthanol dans le vin de palme de la variété *Dura* sont respectivement de $5,23 \pm 0,03$; $45,6 \pm 6,4$ g/L et $0,08 \pm 0,02$ %. Pendant l'exploitation, une diminution progressive du pH, de la viscosité et des taux de sucres associés à une augmentation d'acidité titrable et du taux d'éthanol ont été observés.

Le processus d'exploitation du vin de palme se faisant sur des palmiers à huile abattus pourrait être considéré comme une fermentation semi-continue. Périodiquement (tous les jours, deux fois par jour), les sèves sont collectées et une quantité est laissée dans le récipient de collecte placé sous le palmier dans lequel la sève continue de couler. La récolte se faisant le plus souvent de façon traditionnelle, les microorganismes fermentaires observés dans le vin de palme proviennent donc des outils utilisés (le couteau et les tubes en bambou), l'air et aussi de l'eau de rinçage. Ces microorganismes laissés dans les récipients de collecte se multiplient et les charges augmentent ; donc la compétition devient de plus en plus importante entre eux. Une dégradation rapide du taux de sucres est donc observée dans le starter pour l'obtention de la sève fraîche. C'est le résultat d'une fermentation incontrôlée par la présence de microorganismes fermentaires naturels de la sève du palmier qui devient blanchâtre et effervescente. Le faible taux de sucres observés dans le vin de palme de la variété *Tenera* pourrait être dû soit à une importante variation chimique dans le vin de palme lui-même, soit à la charge élevée de microorganismes dans le récipient de récolte qui transforment les sucres fermentescibles en éthanol, acides lactique et acétique. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par (Amoa-Awua et al 2007).

Les acides organiques détectés dans le vin de palme de la variété *Dura* sont entre autres les acide oxalique ($0,1 \pm 0,01$ g/L), citrique ($0,05 \pm 0,02$ g/L), tartrique ($0,31 \pm 0,04$ g/L), malique ($0,5 \pm 0,02$ g/L), ascorbique ($0,05 \pm 0,002$ g/L), fumarique ($0,01 \pm 0,0005$ g/L), lactique ($0,15 \pm 0,02$ g/L) et acétique ($0,1 \pm 0,02$ g/L). L'acide propionique a été détecté après dix (10) jours d'exploitation.

Pendant l'exploitation, une diminution progressive de l'acide fumarique associée à une augmentation de l'acide acétique, propionique et ascorbique ont été observées. Le taux d'acide ascorbique est plus élevé dans le vin de palme de la variété *Tenera* alors qu'il est faible dans celui de la variété *Dura*. La concentration la plus élevée du taux d'acide ascorbique a été détectée dans le vin de palme de la variété *Tenera* et sa diminution au cours de l'exploitation pourrait s'expliquer par le fait que certains microorganismes en se multipliant, utilisent des acides organiques tel que l'acide ascorbique. L'augmentation du taux des autres acides organiques pendant l'exploitation s'expliquerait par le fait qu'ils sont présents de façon naturelle dans le vin de palme et peuvent donc être produits en quantité suffisante au cours de ce processus. Aussi, la dégradation des sucres par les microorganismes produisent d'importantes quantités d'acides organiques (Akalin et al., 2002 ; Soyer et al., 2003 et Karadeniz, 2004). Les acides oxalique, propionique et acétique n'apparaissent pas dans le vin de palme dès le premier jour mais sont produits au cours de l'exploitation. Les taux

augmentent pour l'acide propionique dans le vin de palme extrait de la variété *Dura* de même que pour les acides oxalique et acétique dans le vin de palme extrait de la variété *Tenera* pendant l'exploitation.

Par ailleurs, la quantité considérable d'acide acétique constatée dans le vin de palme n'est pas une indication de détérioration du vin de palme par des bactéries acétiques comme dans le cas des autres vins. Aussi, l'acide acétique présent dans tous les vins de palme, pourrait être considéré comme faisant partie de l'arôme du vin de palme. De plus, certaines bactéries peuvent produire des quantités équimolaires d'acide acétique à partir du fructose et cela pourrait constituer une source importante d'acide acétique dans le vin de palme (Tesfaye et *al.*, 2002 ; Amoa-Awua et *al.*, 2007 ; Naknean et *al.*, 2010). L'augmentation importante de la teneur en acides organiques pourraient avoir des effets inhibiteurs sur la croissance de certaines populations microbiennes, en particulier celles qui ne supporteraient pas les conditions très acides. C'est ce qui expliquerait la disparition totale des germes anaérobies sulfito-réducteurs après seulement 4 jours d'exploitation des palmiers. En outre l'acide ascorbique, à l'instar de nombreux autres acides organiques comestibles, a été signalé dans l'inhibition de la croissance de pathogènes d'origine alimentaire et de nombreuses bactéries d'altération (Guenier et *al.*, 2010).

3-Conclusion partielle

Au terme de cette étude, des modifications importantes ont été observées au niveau des charges microbiennes et des paramètres physicochimiques pendant l'exploitation des vins de palme. Les charges les plus élevées de microorganismes ont été observées dans le vin de palme extrait de la variété *Tenera* en début d'exploitation. La teneur la plus importante en acide ascorbique a été aussi observée dans le vin de palme de la variété *Tenera*. La disparition des germes anaérobies sulfito-réducteurs a été observée après 4 jours d'exploitation des palmiers. Par conséquent, de nouvelles études sur les propriétés technologiques pourraient aider à élucider le rôle des microorganismes dans la sécurité alimentaire et l'amélioration de la digestion des consommateurs. Pendant que, les acides lactique, malique, oxalique, citrique, fumarique, ascorbique et acétique ont des teneurs plus élevées dans le vin de palme de la variété *Tenera*, l'acide propionique est produit dans le vin de palme de la variété *Dura* après 10 jours d'exploitation. Seulement, le vin de palme de la variété *Dura* pourrait être conseillé aux consommateurs car il contient un taux élevé de sucres, un pH élevé qui se rapproche de la neutralité. Aussi un contrôle hygiénique accentué sur les conditions d'extraction pourrait réduire les sources de contaminations.

Chapitre II

Variations des propriétés microbiologiques et physicochimiques du vin de palme au cours du stockage à température ambiante (28-30°C).

1- Résultats

Dans ce chapitre les vins de palme fraîchement produits le premier jour de l'exploitation du palmier de la variété *Dura* sont désignés par V0. Ceux du 7^{ème} jour, 14^{ème} jour, 21^{ème} jour et du 28^{ème} jour d'exploitation sont désignés respectivement par V1, V2, V3 et V4.

1-1 Paramètres microbiologiques des vins de palme

A partir de chaque palmier, les sèves de la variété *Dura* fraîchement récoltées toutes les semaines ont été l'objet de dénombrement des germes aérobies mésophiles (GAM), de bactéries lactiques, de levures, de coliformes totaux et de coliformes fécaux. Les charges en bactéries lactiques indiquent une forte charge dans le vin du premier jour et diminuent progressivement dans le vin V4. Une augmentation de la charge est observée au niveau des levures où la charge passe de $\log 3,5 \pm 0,3$ UFC/mL à $\log 7,2 \pm 0,3$ UFC/MI dans le vin V3. Les différentes charges en microorganismes présentent des différences significatives au seuil de 5%. Le tableau 10 présente l'ensemble des résultats.

Tableau 10 : Microorganismes isolés des vins de palme fraîchement récoltés par semaine

Microorganismes log (UFC/mL)	Différents vins de palmes				
	V0	V1	V2	V3	V4
Germes aérobies mésophiles (GAM)	8,47±0,2 ^a	8,61±0,1 ^b	9,39±0,3 ^c	9,28±0,2 ^c	7,61±0,1 ^d
Bactéries lactiques	7,33±0,1 ^a	7,07±0,2 ^b	7,38±0,2 ^c	7,43±0,1 ^c	7,26±0,1 ^c
Levures	3,5±0,3 ^{ac}	6,4±0,2 ^b	7,08±0,3 ^a	7,2±0,3 ^a	7±0,3 ^c
Entérocoques	6,18±0,3 ^a	4,95±0,2 ^b	5,26±0,1 ^b	7,15±0,2 ^c	7,66±0,2 ^d
Coliformes totaux	6,45±0,1 ^a	8,76±0,3 ^b	6,97±0,2 ^c	6,81±0,1 ^c	6,18±0,2 ^a
Coliformes fécaux	4,45±0,2 ^a	7,49±0,4 ^b	6,32±0,5 ^c	6,28±0,4 ^{cd}	6,08±0,3 ^d

V0 : vin du premier jour d'exploitation ; V1 : vin du 7^{ème} jour d'exploitation ; V2 : vin du 14^{ème} jour d'exploitation ; V3 : vin du 21^{ème} jour d'exploitation ; V4 : vin du 28^{ème} jour d'exploitation

1-1-1 Charge en coliformes

Tous les vins de palme fraîchement récoltés contiennent des coliformes totaux. Au début de stockage, les charges en coliformes totaux des vins V0 et V4 ne présentent pas de différences significatives au seuil de 5% de même que les vins V2 et V3 contenaient des populations analogues de coliformes totaux. Au cours du stockage, les charges de coliformes totaux dans les différents vins de palme présentent des différences significatives au seuil de 5%. Pendant que la charge en coliformes totaux diminue dans les vins de palme V0 et V1 après 8 heures de stockage, elle augmente légèrement dans les autres vins de palme avant de diminuer. Après 32 heures de stockage, la charge en coliformes totaux est faible dans le vin de palme V0 ($\log 4,1 \pm 0,3$ UFC/mL) et elle est plus élevée et de $\log 7,8 \pm 0,1$ UFC/mL dans le vin de palme V4 (figure 16a).

En ce qui concerne les coliformes fécaux, la charge en début de stockage est plus élevée ($\log 6,1 \pm 0,3$ UFC/mL) dans le vin de palme V1 alors qu'elle est faible ($\log 4,5 \pm 0,2$ UFC/mL) dans le vin de palme V0. Les différentes charges présentent des différences significatives au seuil de 5% en début de stockage (figure 16b). Les charges des coliformes fécaux diminuent et s'annulent après 24 heures de stockage dans tous les vins de palme.

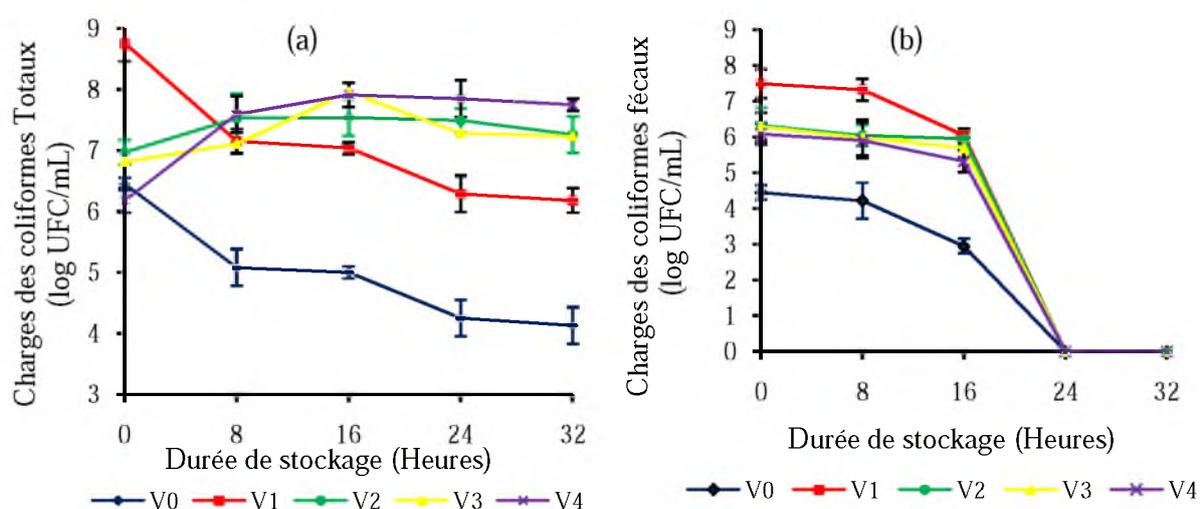


Figure 16 : Evolution de la charge des coliformes totaux (a) et de coliformes fécaux (b) des différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à température ambiante.

V0: sève du premier jour d'exploitation; V1: sève du 7^{ème} jour d'exploitation; V2: sève du 14^{ème} jour d'exploitation; V3: sève du 21^{ème} jour d'exploitation; V4: sève du 28^{ème} jour d'exploitation.

1-1-2 Charges en GAM, bactéries lactiques, Entérocoques et de levures

Les vins de palme fraîchement récoltés contiennent un nombre important de germes aérobies mésophiles (GAM) (figure 17a), de bactéries lactiques (figure 17b), de levures (figure 16c) et d'Entérocoques (figure 16d). La charge en GAM varie en effet de $\log 7,6 \pm 0,1$ à $9,4 \pm 0,3$ UFC/mL. La charge en GAM des vins de palme V0 et V1 ne présentent pas de différences significatives alors qu'elle présente des différences significatives avec celle des autres vins de palme. Pendant le stockage, les charges en GAM augmentent pour atteindre les valeurs maximales après 8 heures de stockage pour les vins V0, V1 et V3 puis diminuent jusqu'à la fin du stockage. L'augmentation de la charge en GAM est beaucoup plus accentuée dans le vin de palme V4 et passe de $\log 7,6 \pm 0,1$ UFC/mL à $\log 10,3 \pm 0,1$ UFC/m/L après 24 heures de stockage.

En début de stockage, la charge des bactéries lactiques est plus élevée ($\log 7,4 \pm 0,1$ UFC/mL) dans le vin de palme V3 alors qu'elle est faible ($\log 7,1 \pm 0,2$ UFC/mL) dans le vin de palme V1. Les différentes charges observées dans les vins de palme ne présentent pas de différences significatives au seuil de 5%. Cependant, la population de bactéries lactiques dénombrée dans les différents sont sensiblement la même. De 0 à 24 heures de stockage à température ambiante cette population a connu un léger accroissement sauf dans le vin V4 où une chute des bactéries lactiques a été enregistrée à la 16^{ème} heure de stockage avec une valeur de $\log 7,8 \pm 0,2$ UFC/mL.

Concernant les levures, la charge en début de stockage, est plus élevée ($\log 7,2 \pm 0,3$ UFC/mL) dans le vin de palme V3 alors qu'elle est faible ($\log 3,5 \pm 0,3$ UFC/mL) dans le vin de palme V0. La charge dans les vins de palme V3 et V4 ne présentent pas de différences significatives alors qu'elles présentent des différences avec la charge des autres vins de palme. Les charges augmentent progressivement puis diminuent jusqu'à la fin du stockage dans tous les vins de palme. Le maximum est atteint après 8 heures de stockage pour les vins V0 et V1 alors qu'il l'est après 24 heures pour les vins V2, V3 et V4. La charge en levures est plus élevée dans le vin de palme V2 avec un maximum ($\log 8,8 \pm 0,2$ UFC/mL) après 24 heures de stockage.

La charge des Entérocoques en début de stockage, est plus élevée ($\log 7,7 \pm 0,2$ UFC/mL) dans le vin de palme V4 alors qu'elle est faible ($\log 4,9 \pm 0,2$ UFC/mL) dans le vin de palme V1. La charge dans les vins de palme V1 et V2 ne présentent pas de différences significatives alors qu'elles présentent des différences avec la charge des autres vins de palme. Pendant le stockage, la charge des Entérocoques a une évolution presque similaire dans tous les vins de palme. Elles augmentent dans un premier temps pour atteindre un

maximum après 24 heures de stockage avant de diminuer progressivement en fin de stockage. Le vin V4 contient la charge la plus élevée pendant 32 heures de stockage avec un maximum (log 8,6 ± 0,1 UFC/mL) à 24 heures.

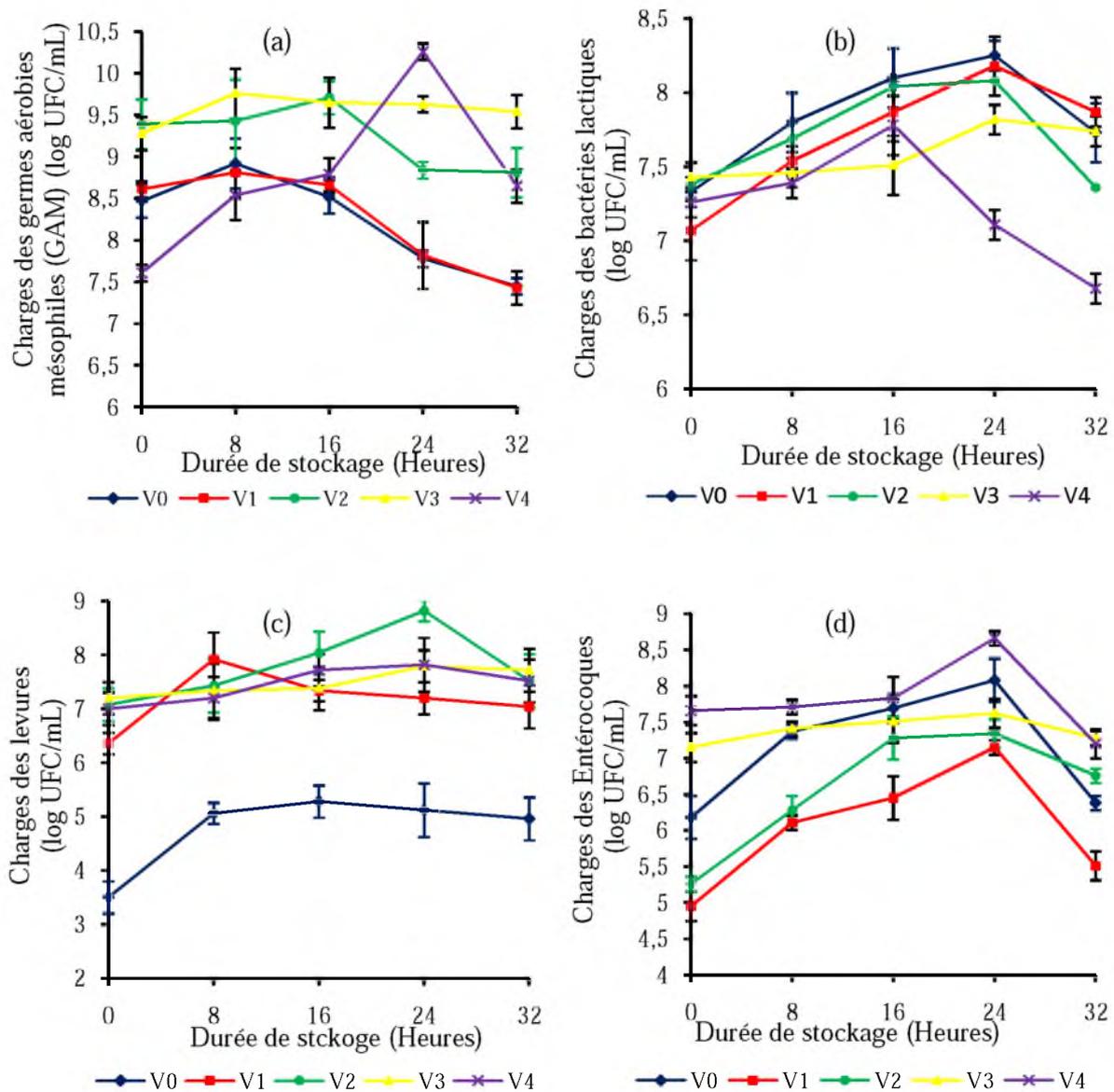


Figure 17 : Evolution de la charge des microorganismes fermentaires des différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à température ambiante.

V0: sève du premier jour d'exploitation; V1: sève du 7^{ème} jour d'exploitation; V2: sève du 14^{ème} jour d'exploitation; V3: sève du 21^{ème} jour d'exploitation; V4: sève du 28^{ème} jour d'exploitation.

1-2 Paramètres physicochimiques des vins de palme

A partir de chaque palmier, les sèves de la variété *Dura* fraîchement récoltées toutes les semaines ont été l'objet d'analyse de quelques paramètres physicochimiques. Les taux des paramètres physicochimiques analysés varient d'un vin à un autre. Pendant que le pH diminue au cours de l'exploitation, l'acidité titrable augmente jusqu'à la fin de l'exploitation. Le taux de sucres totaux abondant dans le vin V0 (502 ± 26 g/L) diminue pour atteindre $54 \pm 3,2$ g/L dans le vin V4. Le taux d'éthanol faible en début d'exploitation ($0,08 \pm 0,02$ %) augmente progressivement pour atteindre un taux de $3,2 \pm 0,1$ % dans le vin V4. L'acide acétique détecté en début ($0,1 \pm 0,02$ g/L) d'exploitation augmente au cours de l'exploitation pour atteindre un taux de $0,77 \pm 0,02$ g/L après 28 jours d'exploitation. Le taux de l'acide fumarique reste faible dans les vins de palme jusqu'à la fin de l'exploitation. Les paramètres analysés présentent des différences significatives les uns avec les autres. L'ensemble des résultats est consigné dans le tableau 11.

Tableau 11 : Paramètres physicochimiques déterminés des vins de palme fraîchement récoltés par semaine

Paramètres	Différents vins de palmes				
	V0	V1	V2	V3	V4
pH	5,23±0,03 ^a	4,02±0,02 ^b	3,77±0,001 ^{bc}	3,72±0,01 ^c	3,43±0,01 ^c
Acidité titrable (%)	0,25±0,02 ^a	0,42±0,01 ^b	0,49±0,03 ^{bc}	0,52±0,01 ^b	0,61±0,02 ^c
Sucres totaux (g/L)	502±26 ^b	210±10,1 ^b	79±6,1 ^c	64±7 ^a	54±3,2 ^d
Sucres réducteurs (g/L)	45,6±6,4 ^a	14,6±3,7 ^b	62±8,4 ^c	41,3±7,8 ^d	22,4±3,7 ^d
Ethanol (%)	0,08±0,02 ^a	0,82±0,04 ^b	1,1±0,23 ^c	1,7±0,06 ^d	3,2±0,1 ^e
Matières sèches (g/L)	17,2±0,42 ^a	14,2±0,81 ^b	14,2±1,34 ^c	13,7±0,94 ^d	12,66±0,13 ^b
Acide oxalique (g/L)	0,09±0,02 ^a	0,129±0,0b001 ^b	0,196±0,03 ^c	0,052±0,05 ^c	0,026±0,002 ^a
Acide citrique (g/L)	0,05±0,03 ^a	0,2±0,03 ^b	0,453±0,01 ^a	0,375±0,05 ^c	0,324±0,02 ^d
Acide tartrique (g/L)	0,31±0,02 ^a	0,44±0,03 ^b	0,789±0,02 ^c	0,797±0,05 ^d	0,705±0,03 ^e
Acide malique (g/L)	0,5±0,02 ^a	0,803±0,03 ^b	0,715±0,05 ^c	0,516±0,03 ^d	0,336±0,02 ^{bc}
Acide ascorbique (g/L)	0,048±0,02 ^a	0,043±0,03 ^a	0,069±0,03 ^b	0,059±0,02 ^c	0,063±0,02 ^c
Acide lactique (g/L)	0,15±0,02 ^a	0,36±0,03 ^b	0,79±0,04 ^c	0,64±0,03 ^d	0,4±0,02 ^e
Acide acétique (g/L)	0,1±0,02 ^a	0,33±0,02 ^b	0,54±0,03 ^c	0,72±0,05 ^c	0,77±0,02 ^d
Acide fumarique (g/L)	0,012±0,0020 ^a	0,009±0,0002 ^a	0,0061±0,0003 ^a	0,0041±0,0001 ^{ab}	0,003±0,0002 ^b

1-2-1 Production de gaz et alcool dans les vins

Pendant le stockage, l'activité métabolique des microorganismes fermentaires dans le vin de palme est perçue par le dégagement de gaz (figure 18a) et par la production d'éthanol (figure 18b). Le dégagement de gaz, exprimés en mL/h (CO₂) à la pression de la salle, augmente dans tous les vins pour atteindre un maximum au bout d'une durée de stockage dépendant du type de vin. Dans le vin de palme V1, le maximum qui est de 135 mL/h (CO₂) est atteint en 11 heures de stockage. Le maximum de dégagement de gaz dans le vin de palme V2 est de 143,5 mL/h (CO₂) et est atteint après seulement 3 heures de stockage. Le vin V3 a un dégagement dont le maximum (72,5 mL/h (CO₂)) est atteint à la 8^{ème} heure de stockage et dans le vin V4, le maximum qui est de 48,5 mL/h (CO₂) est atteint en 10 heures de stockage. Le dégagement de gaz diminue progressivement dans tous les vins jusqu'à la fin du stockage. Dans le vin de palme V1, la diminution est lente jusqu'à la fin du stockage. Elle part de 135 mL/h (CO₂) pour atteindre 53,5 135 mL/h (CO₂) après 32 heures de stockage. La diminution est plus importante dans le vin de palme V2 après la 3^{ème} heure pour atteindre 73 mL/h (CO₂) à la 11^{ème} heure de stockage. Après 11 heures de stockage, la diminution devient lente jusqu'à la fin du stockage. Elle rest faible dans les vins de palme V3 et V4 jusqu'à la fin du stockage. Le dégagement de gaz dans les vins fraîchement récoltés ne présente pas de différences significatives au seuil de 5% entre les vins de palme V1 et V2 de même que les vins de palme V3 et V4. Par contre, les vins de palme V1 et V2 présentent des différences significatives au seuil de 5% avec les vins de palme V3 et V4.

Le taux d'éthanol du vin de palme V0, fraîchement récolté est de $0,075 \pm 0,02$ %. Ce taux reste constant et faible par rapport à celui du vin de palme V4 fraîchement récolté ($3,18 \pm 0,2\%$). Pendant le stockage, les différents taux d'éthanol augmentent progressivement sauf dans le vin V3. Cette augmentation est beaucoup plus forte de 24 à 32 heures de stockage dans le vin de palme V3 et atteint une valeur de $3,64 \pm 0,3\%$ mais le taux reste toujours reste faible dans le vin de palme V0 ($0,24 \pm 0,08\%$)

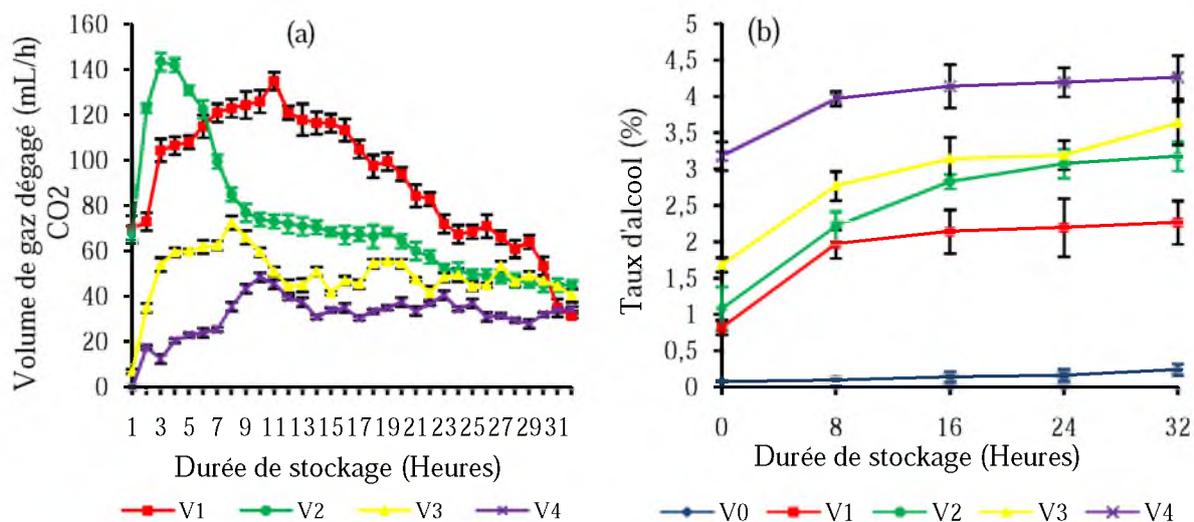


Figure 18 : Production de gaz (a) et d'éthanol (b) des différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à température ambiante (28-30°C).

V0: sève du premier jour d'exploitation; V1: sève du 7^{ème} jour d'exploitation; V2: sève du 14^{ème} jour d'exploitation; V3: sève du 21^{ème} jour d'exploitation; V4: sève du 28^{ème} jour d'exploitation.

1-2-2 pH et acidité titrable des vins de palme

La figure 19 présente l'évolution du pH (a) et de l'acidité titrable (b) des vins de palme pendant le stockage. En début de stockage, le vin de palme V0 a le pH le plus élevé ($5,23 \pm 0,2$) et celui de V4 est plus faible ($3,43 \pm 0,01$). Pendant 32 heures stockage, le pH des différents vins de palme diminue progressivement mais celui du vin V0 présente la diminution la plus importante. Ainsi le pH du vin V0 passe de $5,23 \pm 0,2$ à $3,61 \pm 0,01$ après 32 heures de stockage. Les pH des vins de palme V2 et V3 ne présentent pas de différences significatives au seuil de 5% alors qu'ils sont différents comparés à celui des autres vins de palme (figure 19a). Les acidités titrables présentent les mêmes évolutions que le pH. Les acidités titrables de tous les vins présentent inversement les mêmes évolutions que le pH. Ainsi, l'acidification du vin V0 passe de $0,245 \pm 0,03\%$ à $0,575 \pm 0,01\%$ en 32 heures de stockage (figure 19b).

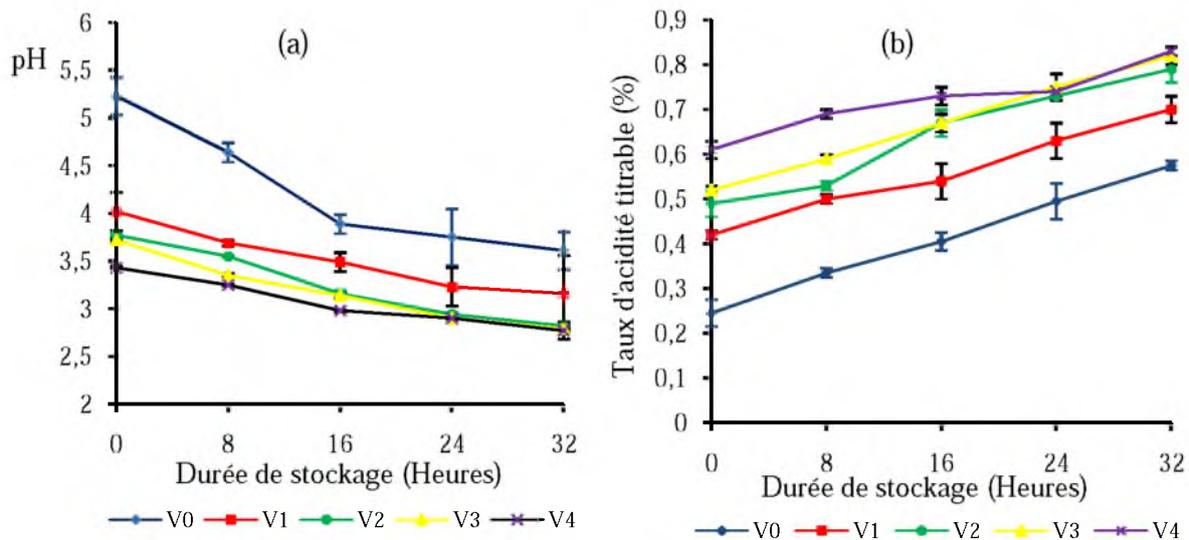


Figure 19 : Evolution des pH (a) et des acidités titrables (b) des différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à température ambiante.

V0: sève du premier jour d'exploitation; V1: sève du 7^{ème} jour d'exploitation; V2: sève du 14^{ème} jour d'exploitation; V3: sève du 21^{ème} jour d'exploitation; V4: sève du 28^{ème} jour d'exploitation.

1-2-3 Taux de sucres des vins de palme

Les teneurs en sucres totaux des différents vins présentent des différences significatives au seuil de 5% en début de stockage. Après 32 heures de stockage, les taux de sucres totaux des vins de palme V2, V3 et V4 ne présentent pas de différences significatives entre eux alors qu'ils présentent des différences comparées à ceux des vins de palme V0 et V1. La teneur en sucres totaux diminue progressivement dans les différents vins de palme pendant le stockage à la température ambiante (28-30°C). Cette diminution est beaucoup plus accentuée dans le vin de palme V0 ($501,68 \pm 22,6$ g/L à $177 \pm 11,37$ g/L) alors qu'elle est faible dans le vin de palme V4 ($98,48 \pm 11,37$ g/L à $30 \pm 5,2$ g/L) (figure 20a). Les sucres réducteurs quant à eux diminuent progressivement aussi pendant le stockage. Cette diminution est plus accentuée également dans le vin de palme V0 où le taux plus élevé ($45,55 \pm 4$ g/L) diminue progressivement pour atteindre une valeur moyenne de $8,66 \pm 3,2$ g/L après 32 heures de stockage (figure 20b). Les différents taux de sucres réducteurs présentent des différences significatives entre eux au seuil de 5% en début de stockage. Après 16 et 24 heures de stockage, les vins de palme V0 et V1 ne présentent pas de teneurs en sucres réducteurs significativement aux différents seuils de 5%. Mais ces deux vins présentent des différences avec les vins V2, V3 et V4 qui contiennent eux des taux en sucres réducteurs analogues.

Cependant, les vins de palme V2, V3 et V4 ne présentent pas de différences significatives au seuil de 5%.

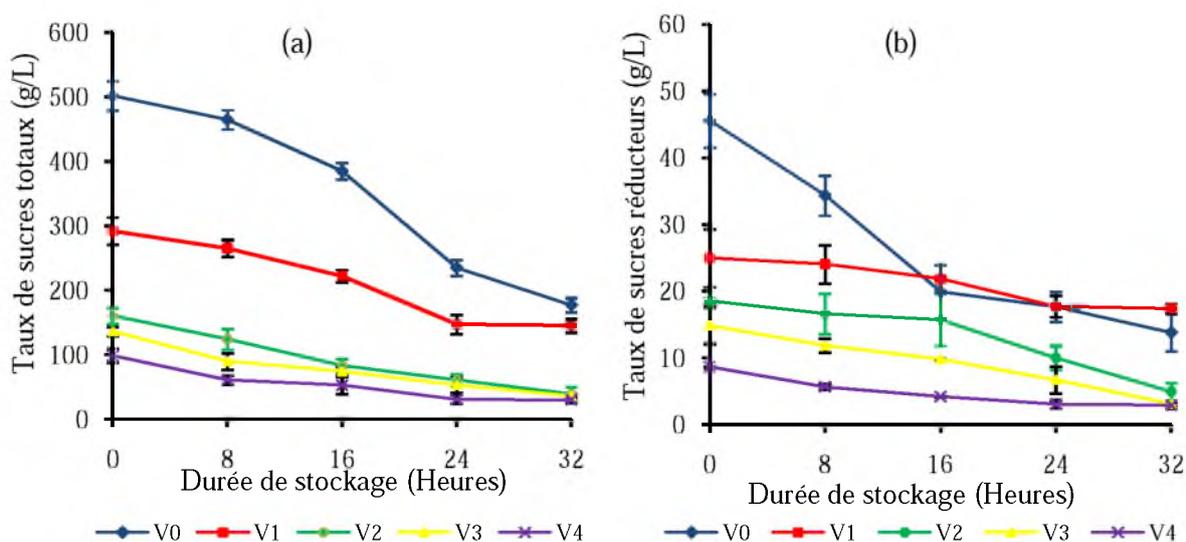


Figure 20 : Evolution du taux de sucres totaux (a) et de sucres réducteurs (b) des différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à température ambiante (28-30°C).

V0: sève du premier jour d'exploitation; V1: sève du 7^{ème} jour d'exploitation; V2: sève du 14^{ème} jour d'exploitation; V3: sève du 21^{ème} jour d'exploitation; V4: sève du 28^{ème} jour d'exploitation.

1-2-4 Taux de matières sèches des vins de palme

Pendant le stockage, le taux des matières sèches des différents vins de palme diminuent progressivement. Elles présentent des évolutions presque similaires dans les différents vins de palme du début jusqu'à la fin du stockage. Le taux de matières sèches diminue plus rapidement dans le vin de palme V0. Elle passe de $17,2 \pm 0,42\%$ à $7,59 \pm 0,13\%$ après 32 heures de stockage.

En début de stockage, les matières sèches du vin de palme V0 présentent des différences significatives avec celles des autres vins de palme alors que celles du vin de palme V1 et V2 sont comparables au seuil de 5%. Après 24 heures de stockage, le vin de palme V3 présente des différences significatives avec les autres vins de palme au seuil de 5%. Mais après 32 heures de stockage, le vin de palme V0 et V1 ne présentent pas de différences significatives au seuil de 5% de même que celui de la deuxième et de la quatrième semaine d'exploitation. La figure 21 présente l'ensemble des résultats.

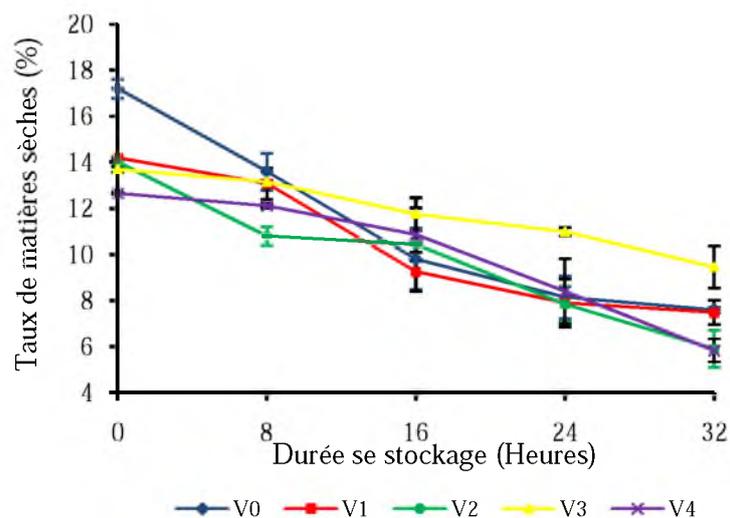


Figure 21 : Evolution du taux de matières sèches des différents vins de palme pendant 32 heures de stockage à température ambiante.

V0: sève du premier jour d'exploitation; V1: sève du 7^{ème} jour d'exploitation; V2: sève du 14^{ème} jour d'exploitation; V3: sève du 21^{ème} jour d'exploitation; V4: sève du 28^{ème} jour d'exploitation.

1-2-5 Acides organiques des vins de palme

Tous les acides organiques observés en début de stockage sont présents à la fin de la fermentation. Il n'y a pas de nouveaux acides organiques détectés au cours du stockage. La cinétique de la variation du taux d'acides organiques varie en fonction de l'acide organique et de la période d'exploitation des palmiers. L'analyse de cette cinétique met en évidence deux (2) groupes d'acides organiques. Le groupe constitué d'acides organiques dont le taux augmente régulièrement pendant toute la durée de stockage. Les autres acides organiques sont constitués d'acides organiques dont le taux augmente de façon transitoire puis diminue et ceux dont le taux diminue dans tous les vins pendant le stockage.

Acides organiques dont le taux augmente

Ce groupe comprend les acides lactique (figure 22a), acétique (figure 22b) et ascorbique (figure 22c). En début de stockage, l'accumulation des acides est très importante dans les vins de palme V2 pour l'acide lactique et ascorbique respectivement $0,794 \pm 0,02$ g/L et $0,069 \pm 0,03$ g/L. La concentration en acide acétique est plus importante dans le vin de palme V4 avec une proportion de $0,77 \pm 0,02$ g/L. Pendant 32 heures de stockage, l'augmentation des

concentrations en acides organiques cités n'est pas la même dans tous les vins. L'augmentation des concentrations en acides lactiques est plus rapide dans le vin de palme V3. Cette augmentation passe de $0,64 \pm 0,02$ g/L à $2,08 \pm 0,05$ g/L. Pour les acides acétique et ascorbique, l'augmentation est respectivement forte dans le vin de palme V0 et V2. En effet, la concentration en acide acétique passe de $0,101 \pm 0,02$ g/L à $0,93 \pm 0,05$ g/L pour l'acide acétique et celle en acide ascorbique atteint $0,579 \pm 0,02$ g/L alors qu'elle était de $0,069 \pm 0,03$ g/L. Les valeurs des acides lactique et ascorbique présentent des différences significatives au seuil de 5%.

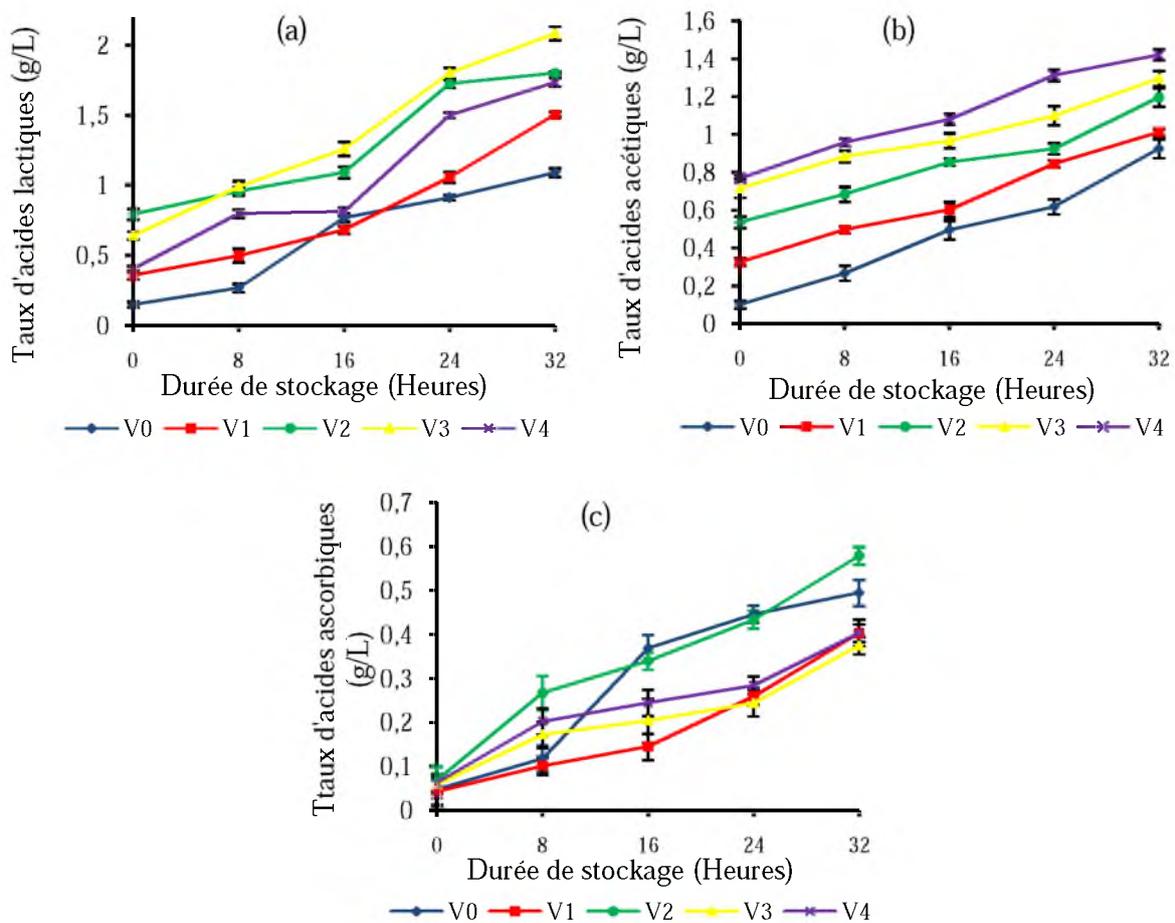


Figure 22 : Evolution des acides organiques dont le taux augmente dans les vins de palme pendant 32 heures de stockage à température ambiante.

V0: sève du premier jour d'exploitation; V1: sève du 7^{ème} jour d'exploitation; V2: sève du 14^{ème} jour d'exploitation; V3: sève du 21^{ème} jour d'exploitation; V4: sève du 28^{ème} jour d'exploitation; a : acide lactique; b : acide acétique; c : acide ascorbique.

Les autres acides organiques

En début de stockage, le vin de palme V2 a les taux d'acides citrique et oxalique les plus élevés et sont respectivement de $0,45 \pm 0,01$ g/L et de $0,19 \pm 0,03$ g/L. Le vin de palme V1 a le taux le plus élevé d'acide malique ($0,80 \pm 0,03$ g/L) alors l'acide fumarique est plus élevé ($0,012 \pm 0,0002$ g/L) dans le vin de palme V0. Quant au vin de palme V3, il contient le plus fort taux d'acide tartrique ($0,797 \pm 0,05$ g/L).

Les acides citrique (figure 23a), malique (figure 23b) et fumarique (figure 23c) présentent presque la même évolution pendant le stockage. Le taux de ces différents acides organiques augmente légèrement après 8 à 16 heures de stockage dans tous les vins de palme puis diminuent progressivement jusqu'à la fin du stockage pour atteindre des concentrations comprises entre $0,1 \pm 0,02$ g/L et $0,3 \pm 0,03$ g/L ; $0,19 \pm 0,03$ g/L et $0,35 \pm 0,01$ g/L ; $0,001 \pm 0,0001$ g/L et $0,008 \pm 0,0003$ g/L pour les acides citrique, malique et fumarique respectivement. Dans le cas particulier de l'acide oxalique (figure 23d), la concentration reste invariable pendant le stockage dans les vins V1 et V4. Dans les vins V2 et V3 sa concentration connaît une nette croissance pendant 24 heures de stockage jusqu'à atteindre $0,57 \pm 0,02$ g/L et $0,66 \pm 0,03$ g/L avant de décliner vers $0,24 \pm 0,02$ g/L et $0,33 \pm 0,02$ g/L à la 32^{ème} heure. Dans le vin V0 la concentration en acide oxalique passe $0,09 \pm 0,01$ g/L à $0,37 \pm 0,02$ g/L en 16 heures de stockage après lesquelles, elle baisse à $0,12 \pm 0,01$ g/L g/L jusqu'à la fin du stockage. A l'opposé des autres acides organiques, la concentration en acide tartrique des différents vins connaît une sensible diminution au cours du stockage (figure 22e). Mais avant le stockage, elle est plus élevée ($0,8 \pm 0,02$ g/L) dans les vins V2 et V3, en moyenne $0,7 \pm 0,02$ g/L dans le vin V4 et plus faible de l'ordre de $0,3 \pm 0,02$ g/L et $0,4 \pm 0,03$ g/L g/L dans les vins V0 et V1. Au cours du stockage, la concentration en acide tartrique de tous les vins baisse au bout de 16 heures et atteint environ $0,4 \pm 0,02$ g/L pour les vins V0, V3 et V4 et environ $0,1 \pm 0,002$ g/L pour les vins V1 et V4. Pendant le reste du temps de stockage, ces concentrations en acide tartrique demeurent inchangées à $0,2 \pm 0,02$ g/L pour V1, V3 et V4 et $0,05 \pm 0,003$ g/L g/L pour le vin V0 jusqu'au terme du stockage.

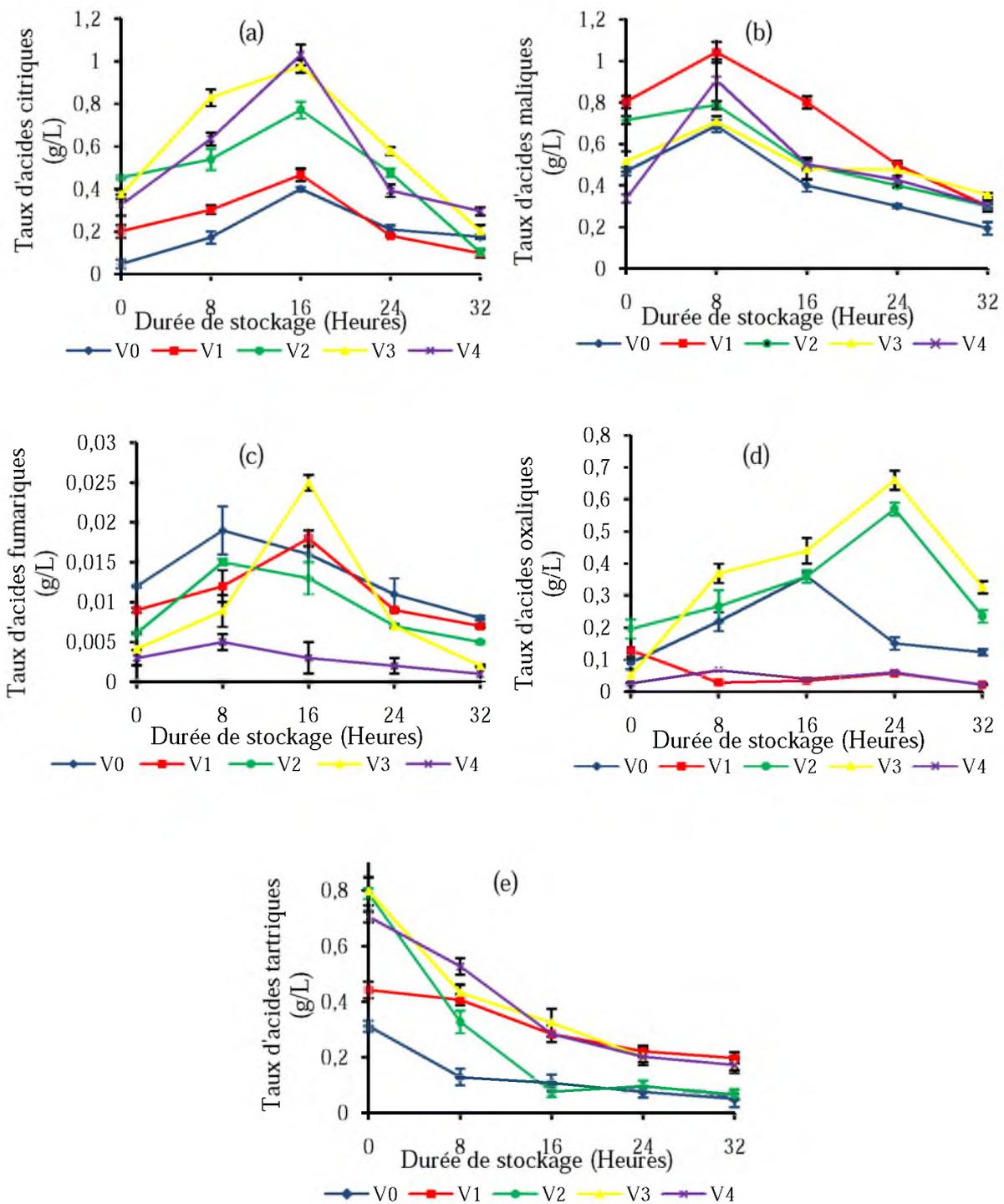


Figure 22e : Taux d'acide tartrique

Figure 23 : Evolution des autres acides organiques présents dans les vins de palme pendant 32 heures de stockage à température ambiante (28-30°C).

V0: sève du premier jour d'exploitation; V1: sève du 7^{ème} jour d'exploitation; V2: sève du 14^{ème} jour d'exploitation; V3: sève du 21^{ème} jour d'exploitation; V4: sève du 28^{ème} jour d'exploitation; a : acide citrique; b : acide malique; c : acide fumarique; d : acide oxalique; e : acide tartrique.

2- Discussion

La sève du palmier est un riche milieu capable de supporter la croissance de plusieurs types de microorganismes. Un grand nombre de germes aérobies mésophiles (GAM), de bactéries lactiques, de levures et d'Entérocoques et de coliformes a été retrouvé dans le vin de palme pendant le stockage. Ces microorganismes présents dans le vin de palme proviennent de ceux qui colonisent certaines parties du palmier (tige de l'inflorescence virile, le pétiole de la feuille, le feutre) et les bases des palmes qui recouvrent le creuset de récolte de la sève. En effet, Farupasi (1973) a rapporté que les microorganismes contenus dans le vin de palme sont apportés par le matériel utilisé par le récolteur et les insectes attirés par le sucre contenu dans la sève de palme.

Le stockage du vin de palme pendant 32 heures présente des variations au niveau de la population des différents microorganismes. La charge en bactéries lactiques dans les différents vins de palme augmente et reste presque constante dans le vin de palme V0, V1 et V2, puis diminue progressivement après 24 heures de stockage. La charge de levures augmente également et atteint sa valeur maximale dans le vin de palme V1 après seulement 8 heures ($\log 7,9 \pm 0,5$ UFC/ml) et le vin V2 après 24 heures ($\log 8,8 \pm 0,2$ UFC/ml), alors que la charge en Entérocoques reste la plus élevée dans le vin de palme V4 jusqu'à la fin du stockage. L'augmentation des charges des microorganismes serait liée à la période d'exploitation des différents vins de palme et aux modifications rapides de paramètres physicochimiques qui créent une pression de sélection sur la flore initiale. Aussi, l'abondance de nutriments tels que les sucres, les acides aminés et les vitamines de la sève du palmier, permettent la croissance de nombreuses espèces de levures et bactéries. Ces résultats sont similaires avec ceux d'Okafor, (1978). Selon lui, après 48 heures de stockage, le pH dans le vin de palme atteint sa valeur minimale (environ 3,5 à 4) et sa concentration en éthanol est maximale. Ainsi, seule la microflore acidophile et résistante à des taux d'éthanol peut subsister. Et cette flore est principalement constituée de levures du genre *Saccharomyces* et de bactéries appartenant aux genres *Streptococcus*, *Leuconostoc*. De plus, la diversité dans la composition des levures, de la microflore et de la nature du substrat contribuent considérablement à la qualité sensorielle du vin de palme (Sipiczki et al., 2001; Ferreira et al., 2002).

Une augmentation initiale suivie d'une diminution des charges en coliformes totaux et de la disparition totale des coliformes fécaux après seulement 24 heures de stockage ont été observées. La diminution des coliformes dans les vins de palme serait due à l'action et la compétition des bactéries lactiques qui ont des propriétés inhibitrices contre la flore

pathogène et indésirable des aliments. Aussi, la disparition des coliformes fécaux après 24 heures de stockage pourrait être due soit à la production de bactériocine par certaines souches de bactéries lactiques, soit à la production d'éthanol qui pourrait leur être défavorable. De telles observations ont été déjà obtenues par les travaux d'Okafor (1978).

Une détérioration rapide des caractéristiques physicochimiques est observée peu de temps après l'extraction de la sève fraîche qui tombe goutte à goutte dans le récipient de collecte. Cette dégradation des sucres est due à la présence d'une suspension microbienne accrue résultant de la croissance des microorganismes fermentaires contenus dans la sève. La sève devient blanchâtre, laiteuse et effervescente. Cette effervescence, exprimée par le dégagement de gaz (CO₂), après la transformation des sucres en alcool et autres sous-produits est plus intense dans les vins V2. Dans le même temps, la dégradation de sucres est plus importante dans cette sève mais la production d'éthanol est plus élevée dans le vin de palme V4 (3,18 ± 0,06%). Les valeurs moyennes des sucres totaux diminuent régulièrement dans tous les vins de palme analysés, avec la baisse très accentuée dans les vins de palme V0 et V1. Ces résultats sont similaires avec ceux des travaux d'Amoa-Awua et *al.*, (2007). Selon eux, pendant 24 heures de stockage du vin de palme, la variation de la charge de nombreux microorganismes présents dans le vin de palme, entraîne l'augmentation du taux d'éthanol de 3,42% à 8,16%. Ils ont aussi démontré que le taux d'éthanol dans le vin de palme augmente en fonction de la période d'exploitation du vin de palme. Pendant le stockage, la croissance des microorganismes entraînent la diminution de la concentration en sucres car ils sont convertis en éthanol et d'autres produits avec production du CO₂. Ces observations sont similaires à ceux des travaux d'Obire, (2005). De plus, la sève du palmier récoltée et stockée subit une fermentation spontanée qui permet la multiplication de plusieurs espèces de levures et de bactéries lactiques transformant le substrat sucré en une boisson alcoolisée contenant d'importants composants alimentaires tels que les acides aminés, les protéines, les vitamines et les sels minéraux (Ezeagu et Fafunso, 2003).

La fermentation alcoolique ne se produit pas dans le vin de palme V0 car ce vin présente un faible taux d'éthanol pendant le stockage. Cela pourrait être dû à son taux élevé de sucres et une faible charge en levures. L'augmentation du taux d'alcool dans les autres vins de palme serait due à la dégradation importante des sucres contenus dans les vins par les microorganismes notamment les levures qui utilisent les sucres fermentescibles qu'elles transforment en éthanol et en dioxyde de carbone (CO₂).

Pendant le stockage, les quantités résiduelles de sucres statistiquement presque identiques observées traduisent une utilisation continue et régulière des sucres par les

microorganismes présents dans les vins de palme. Cependant, la consommation de sucres est importante dans le vin V4 et l'augmentation rapide de la concentration en éthanol démontrent une activité plus intense des microorganismes dans le vin de palme. Les taux d'éthanol obtenus sont similaires à ceux de Nanadoum et *al.*, (2006). En revanche le *pito*, le *burukutu* et la bière *kaffir* ont des degrés alcooliques plus faibles (Odunfa, 1985 ; Sanni et *al.*, 1999). La bière du Togo n'atteint la valeur de 4,05% d'éthanol qu'après 36 heures de fermentation (Périsse et *al.*, 1959).

Les acides organiques, support de l'acidité du vin de palme, proviennent essentiellement de la dégradation des sucres du vin de palme. Une grande variété d'acides organiques est présente dans le vin de palme pendant le stockage : acides oxalique, citrique, tartrique, malique, lactique, acétique, fumarique et propionique. Le stockage du vin de palme conduit à l'accumulation de certains acides organiques à des concentrations très élevées et à la diminution d'autres dans tous les vins de palme stockés. En effet, en raison de la présence des organismes vivants dans le vin de palme, son goût sucré agréable est vite perdu et remplacé par l'acidité produite par l'action des bactéries lactiques et des levures. Les teneurs en acides lactique, acétique et ascorbique augmentent en 32 heures de stockage. L'accumulation de ces acides est très importante dans les vins de palme V2 et V3 pour les acides lactique et ascorbique respectivement $2,084 \pm 0,05$ g/L et de $0,579 \pm 0,02$ g/L et dans les vins de palme V3 et V4 pour l'acide acétique ($0,7 \pm 0,2$ g/L). Dans le vin de palme en fermentation, l'acide acétique est aussi le plus abondant des acides organiques, ce qui représente 4,2 % selon les travaux réalisés par Uzochukwu et *al.*, 1997. Dans le vin, l'acide acétique est produit à 0,6-3,4 g/L selon les travaux de Romano et *al.*, (2003) par contre Odunfa (1985) rapporte que cet acide ne doit pas être présent dans la bière de sorgho produite en Afrique du Sud car il en serait la principale cause d'altération. La présence de l'acide acétique dans le vin de palme pendant le stockage, peut être attribuée au métabolisme des bactéries lactiques hétérofermentaires dont certaines espèces ont été identifiées dans le moût de *pito* et de *dolo* (Sawadogo-Lingani et *al.*, 2007). Cet acide pourrait être formé au cours de la fermentation en fonction des souches de levures. Des études rapportent que dans le cas du vin, plusieurs autres facteurs favoriseraient la production d'acide acétique par les souches de *S. cerevisiae* (Llaurado, 2002).

La teneur en acide tartrique diminue, mais celle des autres acides augmentent après 8-16 heures ou 24 heures avant de diminuer après 32 heures de stockage pour tous les autres échantillons. La diminution des acides organiques est attribuée à leur utilisation comme substrat dans des réactions secondaires. La croissance est liée à une production soit par les

levures à partir de la réduction du pyruvate en utilisant l'activité lactate-deshydrogenase soit par les bactéries lactiques présentes dans le vin de palme (Llaurado, 2002). L'importante augmentation des teneurs en acides organiques pourrait avoir un effet inhibiteur sur la croissance microbienne, en particulier ceux qui ne supporteraient pas les conditions très acides. C'est ce qui expliquerait l'augmentation initiale suivie d'une diminution des charges en coliformes totaux et de la disparition totale des coliformes fécaux après seulement 24 heures de stockage. Ceci est en accord avec la cinétique de l'élimination signalée dans les travaux réalisés par Nout et *al*, 1989 et Masha et *al*, 1998. De plus, l'acide ascorbique, comme beaucoup d'autres acides organiques alimentaires, a été signalé comme inhibiteur de la croissance de nombreuses bactéries pathogènes et d'altération des aliments (Guenier et *al*, 2010).

3- Conclusion partielle

Cette étude a montré que les paramètres physicochimiques et microbiologiques du vin de palme connaissent des variations pendant le stockage des différentes sèves de palmiers à huile. En effet, la charge microbienne du vin de palme atteint sa valeur maximale dans le vin de palme V2. Pendant le stockage, les microorganismes transforment les sucres en éthanol avec production de dioxyde de carbone (CO₂) et d'acides organiques. Les paramètres physicochimiques tels la teneur en sucres et le pH diminuent mais l'acidité titrable et la teneur en vitamine C augmentent pendant le stockage.

Une nette amélioration doit être apportée aux conditions de stockage pour éviter une altération de ses propriétés physicochimiques par les microorganismes. Pour ce faire, une maîtrise et une connaissance des germes contaminant le vin de palme permettraient d'éviter son altération rapide. Mais la présence d'une population importante de bactéries lactiques dans les différents vins de palme pourrait avoir un effet bénéfique sur la santé du consommateur et donc augmenter l'intérêt de cette boisson.

Chapitre III

Diversité et dynamique des bactéries lactiques dans les vins de palme

1- Résultats

1-1 Diversité des bactéries lactiques isolées

1-1-1 Caractères morphologiques et physiologiques des bactéries lactiques isolées des vins de palme

Sur la base de leurs caractères morphologiques, de leurs types fermentaires et des caractères biochimiques des bactéries lactiques, cinq genres de bactéries ont été isolés dans les vins de palme. Il s'agit entre autres des colonies de *Lactobacillus*, des colonies de *Pediococcus*, des colonies de *Carnobacterium*, des colonies de *Weissella* et des colonies de *Leuconostoc*.

1-2 Espèces de bactéries lactiques isolées des vins de palme

1-2-1 Espèces identifiées par Galerie API 50 CHL

Les isolats identifiés (140) ont été rattachés à 5 groupes et distribués par ordre de grandeur (figure 24). Soixante quatorze (74) souches ont été identifiées comme le genre *Lactobacillus* avec une proportion de 52,86%. Le genre *Pediococcus* représente 31,43% avec un nombre total de quarante quatre (44) souches alors que douze (12) souches ont été identifiées comme *Carnobacterium* et représentent 8,57% des souches. Les genres *Weissella* et *Leuconostoc* représentent 3,57% chacun. Le genre *Lactobacillus* constitue le genre dominant des bactéries lactiques identifiées.

L'étude du métabolisme des hydrates de carbones réalisée avec la galerie API 50 CHL sur les soixante quatorze (74) souches du genre *Lactobacillus* a permis d'identifier que douze (12) isolats appartiennent à *L. pentosus*, dix (10) à *L. brevis 1*, six (6) à *L. plantarum 1*, cinq (5) à *L. curvatus*, sept (7) à *L. delbrueckii sp delbrueckii*, vingt quatre (24) à *L. delbrueckii sp bulgaricus* et six (6) à *Lactobacillus delbrueckii sp lactis 1*. Les quarante quatre (44) souches de *Pediococcus* sont composées de dix-huit (18) espèces de *P. pentosaceus*, de quatorze (14) espèces de *P. acidilactici*, de sept (7) et cinq (5) espèces de *P. damnosus 1* et 2 (Tableau 12).

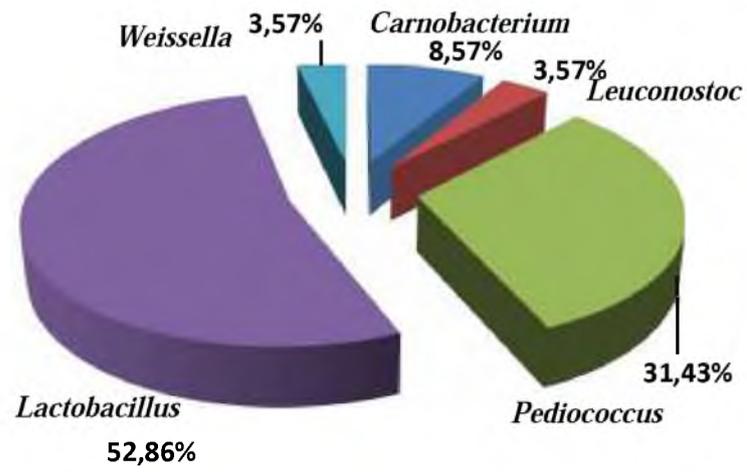


Figure 24 : Différents genres de bactéries lactiques isolés du vin de palme.

Tableau 12 : Bactéries lactiques isolées du vin de palme

Codes d'identifications	Nom des microorganismes après identification par la galerie API 50 CHL	Groupe	% du type fermentaire	
			Homo	Hétéro
G ₁₀ ; G ₉ ; B ₁ ; K ₃ ⁸ ; H ₆ ; J ₁	<i>Carnobacterium divergens</i>	I	20	80
G ₈ ; G ₇ ; G ₄ ; C ₆ ; K ₁ ⁵	<i>Weissella viridescens</i>	II	100	
J ₆ ; J ₈ ; D ₂ ; B ₁₀ ; B ₈ ; E ₄ ; J ₉ ; H ₅ ; G ₃ ; K ₁ ⁹ ; K ₁ ⁶ ; K ₃ ⁹ ; K ₃ ¹⁰ ; H ₄ ; D ₅ ; B ₅ ; A ₈ ; K ₄ ⁴	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	III	100	0
K ₃ ¹ ; C ₄ ; K ₂ ⁷ ; K ₂ ³ ; F ₆	<i>Pediococcus damnosus 2</i>	IV	100	0
K ₃ ⁴ ; K ₂ ⁸ ; K ₃ ⁵ ; D ₁₀ ; D ₃ ; E ₂ ; E ₃ ; E ₅ ; J ₂ ; J ₄ ; J ₅ ; A ₇ ; F ₇ ; G ₂	<i>Pediococcus acidilactici</i>	V	100	0
I ₅ ; I ₆ ; I ₈ ; C ₅ ; A ₅ ; F ₅ ; B ₇ ; A ₉ ; H ₉ ; A ₁₀ ; A ₄ ; A ₆	<i>Lactobacillus pentosus</i>	VI	16,67	83,33
G ₅ ; D ₇ ; H ₁ ; H ₈ ; F ₁₀ ; H ₇ ; H ₃ ; E ₁ ; D ₉ ; F ₁	<i>Lactobacillus brevis 1</i>	VII	0	100
F ₂ ; B ₃ ; B ₉ ; F ₄ ; F ₃	<i>Leuconostoc mesenteroides/dextranicum 2</i>	VIII	60	40
I ₁ ; I ₂ ; I ₄ ; H ₁₀ ; G ₁ ; C ₁	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	IX	100	0
D ₈ ; D ₆ ; J ₁₀ ; G ₆ ; J ₃	<i>Lactobacillus curvatus sp curvatus</i>	X	100	0
B ₂ ; A ₃ ; C ₇ ; I ₉ ; I ₇ ; I ₁₀ ; C ₂	<i>Lactobacillus delbrueckii sp delbrueckii</i>	XI	42,86	57,14
A ₂ ; A ₁ ; H ₂ ; C ₁₀ ; I ₃ ; B ₄ ; C ₈	<i>Pediococcus damnosus 1</i>	XII	100	0
K ₂ ¹ ; C ₃ ; C ₉ ; K ₁ ² ; K ₁ ¹ ; D ₁	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	XIII	100	0
K ₁ ⁸ ; K ₁ ⁷ ; K ₂ ² ; K ₂ ⁹ ; K ₂ ¹⁰ ; K ₃ ² ; K ₃ ³ ; K ₃ ⁷ ; K ₄ ¹ ; K ₄ ² ; K ₄ ³ ; K ₄ ⁵ ; K ₄ ⁶ ; K ₄ ⁷ ; E ₆ ; K ₂ ⁶ ; K ₂ ⁵ ; K ₁ ³ ; J ₇ ; K ₁ ⁴ ; K ₁ ¹⁰ ; K ₃ ⁶ ; E ₈ ; E ₉	<i>Lactobacillus delbrueckii sp bulgaricus</i>	XIV	95,83	4,17
F ₉ ; B ₆ ; E ₇ ; K ₄ ⁹ ; K ₄ ⁸ ; K ₄ ¹⁰	<i>Lactobacillus delbrueckii sp lactis 1</i>	XV	33,33	66,67

Le chiffre romain indique les différents groupes

1-2-2 Répartition des isolats pendant l'exploitation et le stockage du vin de palme.

Dans l'ensemble, l'identification montre que *Lactobacillus delbrueckii sp bulgaricus* est l'espèce dominante avec 17,14% des cas suivie de *Pediococcus pentosaceus* qui représente 15,71%. Les espèces *Lactobacillus pentosus* et *Lactobacillus brevis 1* représentent respectivement 8,57% et 7,14% de l'ensemble des souches identifiées.

Les bactéries lactiques isolées au cours de l'exploitation des palmiers sont majoritairement constituées de *Pediococcus pentosaceus* avec une proportion de 9,29% des souches identifiées suivie de *Lactobacillus pentosus* (8,57%). Ensuite les espèces de *Pediococcus acidilactici* et de *Lactobacillus brevis 1* représente respectivement 7,86% et 7,14%. Pour ce qui concerne le vin V3, stocké pendant 32 heures à température ambiante, *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* est l'espèce majoritairement isolée avec une proportion de 14,29%. L'ensemble des résultats est rapporté par le tableau 13.

Tableau 13 : Proportion des espèces de bactéries lactiques isolées des vins de palme fraîchement récoltés et des vins de palme stockés à température ambiante

Nom des bactéries identifiées	Nombre de souches	Pourcentage des isolats (%)		Pourcentage de l'ensemble des isolats (%)
		Exploitation	Stockage (V3)	
<i>Carnobacterium divergens</i>	6	3,57	0,72	4,29
<i>Weissella viridescens</i>	5	2,86	0,71	3,57
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	18	9,29	6,42	15,71
<i>Pediococcus damnosus 2</i>	5	1,43	2,14	3,57
<i>Pediococcus acidilactici</i>	14	7,86	2,14	10
<i>Lactobacillus pentosus</i>	12	8,57	0	8,57
<i>Lactobacillus brevis 1</i>	10	7,14	0	7,14
<i>Leuconostoc mesenteroides/dextranicum 2</i>	5	3,57	0	3,57
<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	6	4,29	0	4,29
<i>Lactobacillus curvatus sp curvatus</i>	5	3,57	0	3,57
<i>Lactobacillus delbrueckii sp delbrueckii</i>	7	5	0	5
<i>Pediococcus damnosus 1</i>	7	5	0	5
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	6	2,14	2,15	4,29
<i>Lactobacillus delbrueckii sp bulgaricus</i>	24	2,85	14,29	17,14
<i>Lactobacillus delbrueckii sp lactis 1</i>	6	2,14	2,15	4,29
Total des souches	140	69,28	30,72	100

1-2-2-1 Dynamique des bactéries lactiques pendant l'exploitation du vin de palme

Les vins de palme présentent une très grande diversité d'espèces de bactéries lactiques pendant l'exploitation des palmiers. Ces espèces de bactéries lactiques se succèdent différemment dans les vins de palme produits successivement (figure 25). En effet, en début d'exploitation des palmiers, six (6) espèces de bactéries lactiques sont isolées. Ce sont entre autres *Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis* et *Pediococcus damnosus* qui est l'espèce de bactérie lactique majoritaire (33,33%) du vin de palme produit le premier jour d'exploitation. Cette espèce qui est présente durant les 7 premiers jours d'xploitation disparaît à partir du 10^{ème} jour pour ensuite réapparaître le 22^{ème} jour d'exploitation. Il en est de même pour *P. acidilactici* qui lui disparaît au 10^{ème} jour pour ne réapparaître qu'au 25^{ème} jour. *L. pentosus*

qui est la 2^{ème} espèce majoritaire en debut d'exploitation a été détectée les 7^{ème}, 16^{ème}, 22^{ème} et 25^{ème} jours d'exploitation. Quant à *P. pentosaceus*, elle est pratiquement présente en des proportions comprises entre 5,56 et 16,67% durant toute la période d'exploitation. L'espèce *Ln. Mesenteroides*, absente au premier jour d'exploitation apparait de façon majoritaire les 4^{ème} (40%) et 16^{ème} jours (50%). *C. maltaromaticum*, qui est détecté à partir du 4^{ème} jour d'exploitation devient majoritaire au 7^{ème} jour et demeure présent jusqu'au 25^{ème} jour. Quant à *L. brevis*, il n'apparait que le 10^{ème} jour d'exploitation où il est majoritaire (27%) et demeure jusqu'au 22^{ème} jour qu'il domine également (37%).

L'ensemble de ces résultats montre que les vins de palme produits successivement chaque jour differt les uns des autres par la composition des espèces de bactéries lactiques.

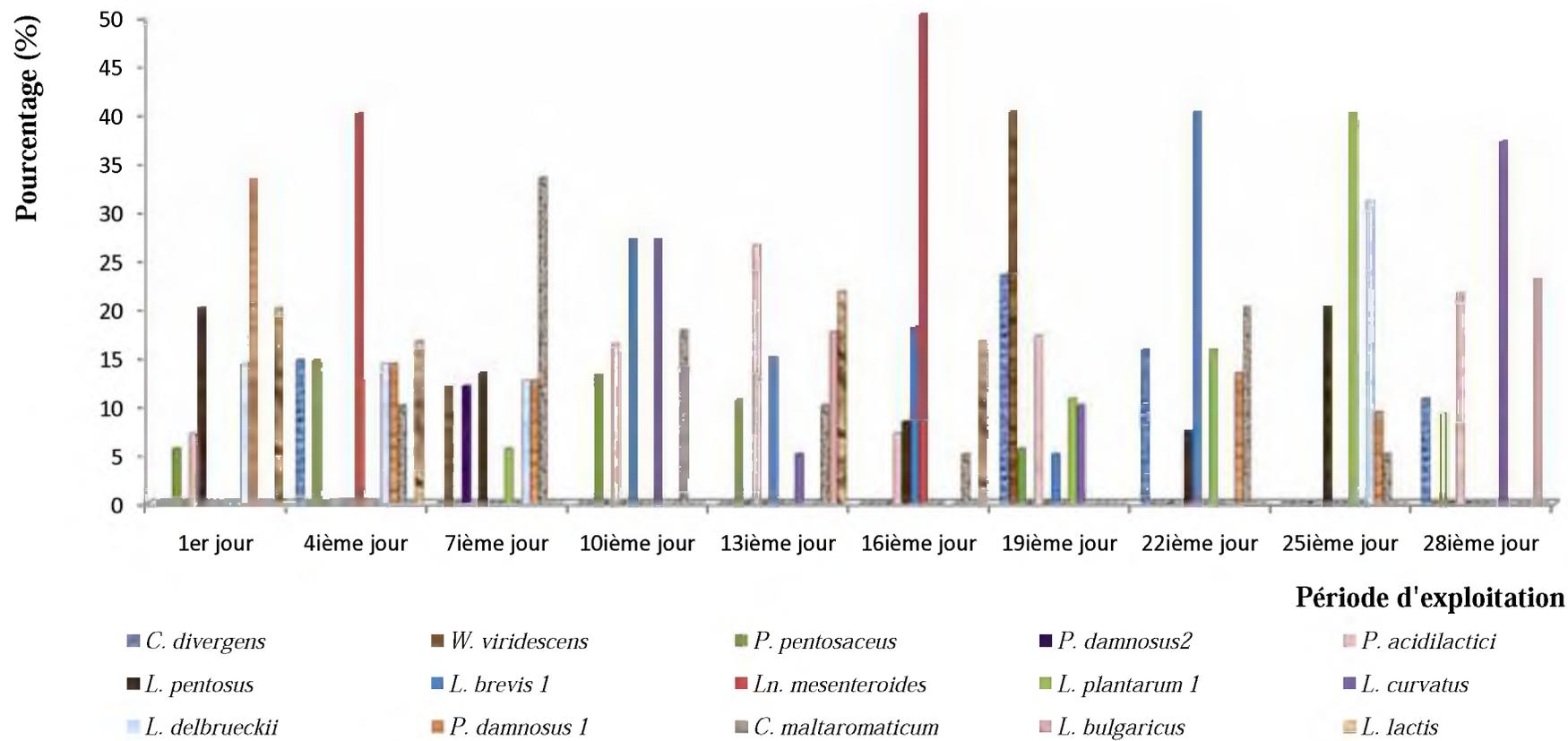


Figure 25 : Succession et proportion des différentes espèces de bactéries lactiques isolées pendant l'exploitation des vins de palme

1-2-2-2 Dynamique des bactéries lactiques pendant le stockage du vin de palme

La succession des espèces de bactéries lactiques identifiées pendant le stockage du vin de palme de la 3^{ème} semaine d'exploitation (V3) sont représentées à la figure 26. En début de stockage, les espèces isolées sont *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella viridescens* et *Carnobacterium divergens* parmi lesquelles *Weissella viridescens* (40%) et *Carnobacterium divergens* (23,33%) sont les espèces majoritaires. Pendant que le nombre de *Weissella viridescens* isolée diminue puis s'annule après 16 heures de stockage, celui de *Carnobacterium divergens* diminue et s'annule après seulement 8 heures. Par ailleurs, le nombre de *Pediococcus acidilactici* (3^{ème} espèce majoritaire en début de stockage) diminue progressivement tout au long du stockage pour s'annuler à la 32^{ème} heure quand ceux de *Lactobacillus plantarum* 1 (10,67%) et *L. curvatus* (10%) également détectées en début de stockage s'annulent après seulement 16 heures de stockage. Les espèces telles que *Carnobacterium maltaromaticum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Pediococcus damnosus* 2 et *L. lactis* apparaissent après 8 heures dans des proportions respectives de 5,56%, 4%, 5,56%, et 5,56%. Durant le stockage, le nombre de *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus lactis* augmentent progressivement et ces deux espèces deviennent avec l'espèce *Pediococcus pentosaceus* les seules espèces présentes dans les vins à la fin du stockage.

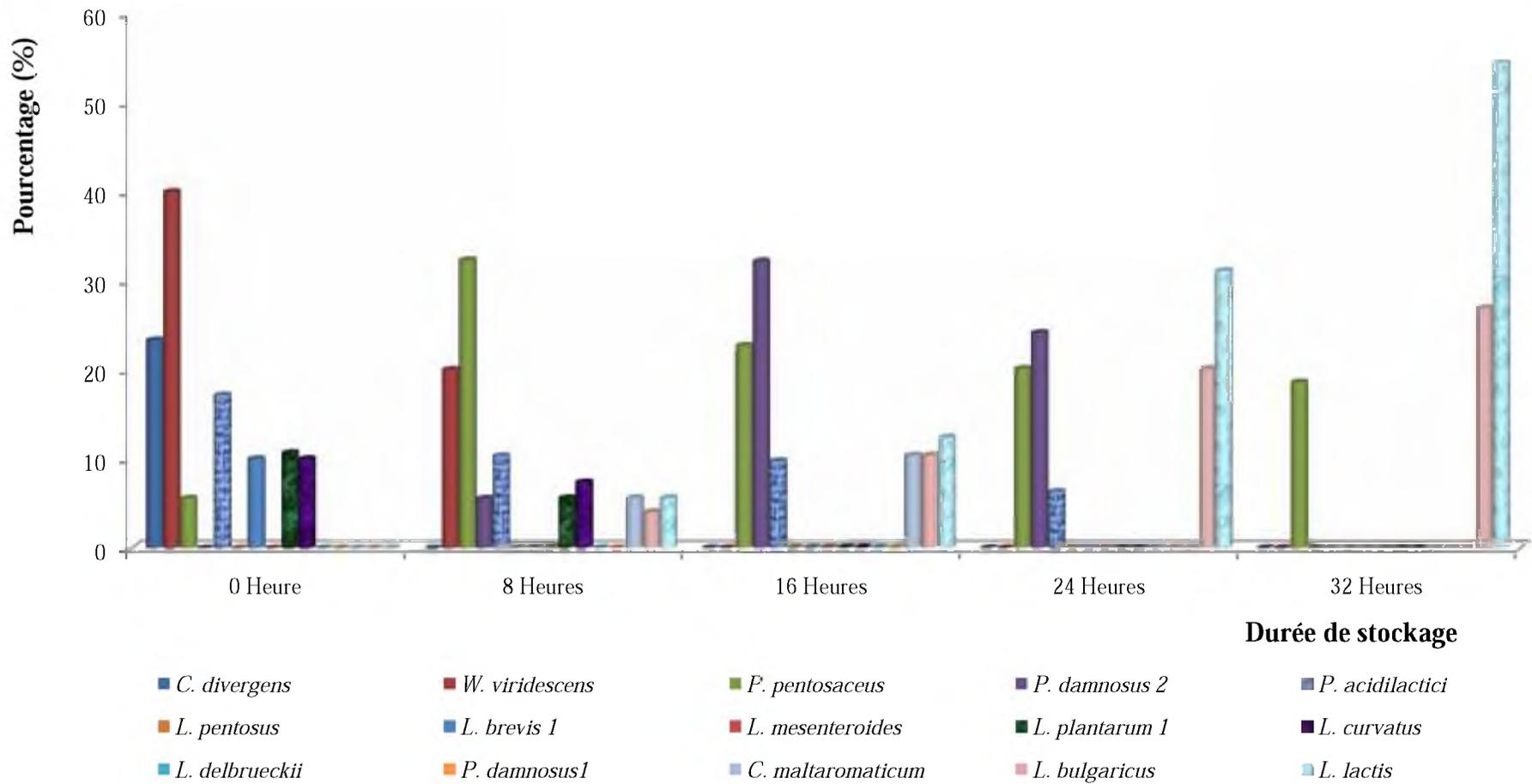


Figure 26 : Succession et proportion des différentes espèces de bactéries lactiques isolées pendant le stockage des vins de palme V3.

2- Discussion

Dans la présente étude, un système d'identification basé sur les caractères morphologiques, les types fermentaires et des caractères biochimiques des bactéries lactiques a permis de les regrouper en genres. Parmi les 5 genres de bactéries lactiques, le genre *Lactobacillus* est dominant avec une proportion de 52,86% suivi de *Pediococcus* qui représente 31,43%.

La proportion élevée de *Lactobacillus* et de *Pediococcus* dans le vin de palme est synonyme de production d'une grande quantité d'acides organiques. La production d'acides organiques dans le vin de palme entraîne la chute du pH. C'est ce qui explique le faible pH dans les différents vins de palme récoltés. Ces résultats sont en accord avec ceux de Assi, (2003) et Nwachukwu et al. (2006) qui ont montré que le vin de palme contient des levures en particulier les *Saccharomyces* et des bactéries constituées à majorité des genres *Zymomonas* et *Lactobacillus*. Par ailleurs, les bactéries lactiques ne sont généralement pas des microorganismes pathogènes mais ayant des propriétés biologiques intéressantes, largement exploitées dans de nombreux procédés industriels (Desmazeaud, 1996 ; Vandamme et al., 1996 ; Soomro et al., 2002 ; Bergqvist et al., 2005). Elles ont, en effet, des propriétés inhibitrices contre la flore indésirable et pathogène des aliments ; et permettent donc d'augmenter la durée de conservation de ces aliments. Elles améliorent aussi les qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments et exercent un effet bénéfique sur la santé des hommes et des animaux (Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Soomro et al., 2002 ; Rosenfeldt et al., 2004 ; Bergqvist et al., 2005).

Pendant l'exploitation du vin de palme, l'espèce *Pediococcus pentosaceus* est dominante avec une proportion de 9,29%. La deuxième espèce dominante est *Lactobacillus pentosus* avec une proportion de 8,57%. Les espèces *Pediococcus acidilactici* et *Lactobacillus brevis 1* ne sont pas négligeables avec des proportions respectives de 7,86% et 7,14%. En plus de ces espèces, des espèces minoritaires ont été également identifiées. Ce sont entre autres : *Carnobacterium divergens*, *Weissella viridescens*, *Pediococcus damnosus 2*, *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum 2*, *Lactobacillus plantarum 1*, *Lactobacillus curvatus ssp curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii*, *Pediococcus damnosus 1*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp lactis 1*. Par ailleurs, l'étude physiologique des isolats de *Pediococcus pentosaceus* pris au hasard a permis de révéler que toutes les souches sont homofermentaires et les isolats de *Lactobacillus pentosus* sont composés de 83,33% de souches homofermentaires et 16,67% de souches hétérofermentaires. Les espèces de *Pediococcus*

pentosaceus et *Lactobacillus pentosus* seraient responsables de l'acidification du vin de palme pendant l'exploitation. De plus les espèces minoritaires telles que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus acidilactici* isolées du vin de palme seraient aussi responsable respectivement du goût aigre et de l'aspect laiteux du vin de palme. Les résultats obtenus ne correspondent pas à ceux de Amoa-Awua et al. (2007). D'après leurs travaux, les espèces dominantes des vins de palme sont *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides* ; elles sont donc responsables de l'acidification rapide du goût aigre du vin de palme des palmiers abattus au Ghana. De plus, Uzochukwu et al., (1994) ont isolé *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum* et *Lactobacillus sp* d'échantillons du vin de palme au Nigéria. Depuis longtemps Bassir (1968) avait rapporté que *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides* étaient responsables du goût aigre du vin de palme extrait sur le palmier vivant. *Lactobacillus brevis 1* et *Lactobacillus plantarum 1* détectés dans les vins de palme sont souvent cités comme des agents d'altération de la qualité marchande des bières modernes et traditionnelles.

Les souches de *Lactobacillus plantarum* identifiées dans cette étude sont homofermentaires. Les souches de *Lactobacillus* homofermentaires et hétérofermentaires facultatifs ont été isolées par plusieurs auteurs (Johansson et al., 1995 ; Kunéné et al., 2000 ; Mannu et al., 2000 ; Sánchez et al., 2000 ; Kostinek et al., 2005). Cette espèce est d'une importance capitale dans plusieurs aliments fermentés ; mais dans la présente étude elle ne semble pas être beaucoup impliquée dans la production du goût aigre du vin de palme. En effet, *Lactobacillus plantarum* représente 4,29% des bactéries lactiques identifiées dans le vin de palme pendant l'exploitation.

Les souches de bactéries lactiques isolées du vin palme pendant l'exploitation présentent une grande diversité de caractère phénotypique. Cette diversité serait probablement liée à l'origine diversifiée des microorganismes et à la composition de la sève de palme. Ces résultats sont similaires à ceux de Tchiendji (1985) qui stipule que les bactéries dans le vin de palme proviennent du sol, de l'eau et de la peau de l'homme. De plus, les microorganismes apportés par les nombreux insectes attirés par les sucres contenus dans la sève constituent également une des multiples sources de contaminations de la sève du palmier. Ces microorganismes peuvent être les contaminants des eaux non stérilisées utilisées pour la dilution des vins de palme par les récolteurs, dans le but d'augmenter le volume du vin récolté (Wang et al., 2004). C'est ce qui expliquerait aussi la diversité des acides organiques détectés dans le vin de palme pendant l'exploitation des palmiers.

Pendant le stockage du vin de palme, *Lactobacillus delbrueckii sp bulgaricus* est la souche dominante avec une proportion de 14,29%. En plus de cette espèce, des espèces

minoritaires ont été également identifiées. Ce sont entre autres : *Carnobacterium divergens*, *Weissella viridescens*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus damnosus* 2, *Pediococcus acidilactici*, *Carnobacterium maltaromaticum* et *Lactobacillus delbrueckii ssp lactis* 1. La présence de ces microorganismes dans le vin de palme pourrait être due aux microorganismes qui colonisent les palmiers à huile, le récipient de collecte et ceux des instruments utilisés pour la récolte du vin de palme. Les travaux réalisés par Atputharajah et al. (1986) indiquent la présence de 17 espèces de levures et 7 genres de bactéries lactiques dans la fermentation spontanée du vin de palme.

Par ailleurs, l'étude physiologique des isolats de *Lactobacillus delbrueckii sp bulgaricus* pris au hasard a permis de révéler que toutes les souches sont composés de 95,83% de souches homofermentaires et 4,17% de souches hétérofermentaires. L'espèce *Lactobacillus delbrueckii sp bulgaricus* est utilisée dans le commerce pour la production de yogourt. Cependant, *Lactobacillus plantarum* est l'espèce prédominante parmi les bactéries lactiques dans le boza, un breuvage bulgare (Gotcheva et al., 2001), le *chibuku*, une bière opaque produite au Zimbabwe (Togo et al., 2002), le *poto-poto* congolais et le *pozol* mexicain, des pâtes de maïs fermentées (Ben Omar et Ampe, 2000 ; Louembé et al., 2003 ; Ben Omar et al., 2008), les aliments de sevrage à base de sorgho fermenté (Kunéné et al., 2000), la pâte de manioc fermentée (Oyewole et Odunfa, 1990 ; Amoa-Awua et al., 1996 ; Ampe et al., 2001 ; Adebayo-Tayo et Onilude, 2008). Pendant le stockage, l'espèce *Lactobacillus lactis* serait responsable de l'aspect laiteux du vin de palme. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lasekan et al. (2007). Selon eux, les espèces de *Lactobacillus lactis* sont responsables de la couleur blanchâtre du vin de palme pendant le stockage par la production de dextrans dans la boisson. En effet, cette espèce devient dominante après 32 heures de stockage. La production des acides organiques dans le vin de palme permet donc l'acidification du vin de palme. De plus, le vin de palme frais est riche et majoritairement constitué de sucres. Cependant, les bactéries lactiques présentes dans le vin transforment les sucres en acides organiques et alcool (Naknean et al., 2010).

Aucun des isolats testés n'appartient aux espèces *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus mindensis*, *Lactobacillus paraalimentarius* et *Lactobacillus alimentarius*. La présence de ces espèces n'est pas mentionnée non plus dans les boissons africaines mais elles se trouvent dans d'autres aliments fermentés (Ehrmann et al., 2003).

Des 140 isolats testées avec la galerie API 50 CHL, aucune ne fermente l'amidon. Cela démontre clairement qu'elles ne sont pas capables de produire l'amylase. Cette incapacité peut être expliquée par la nature du sucre contenu dans le vin de palme. En effet, le vin de

palme contient déjà des sucres fermentescibles utilisables directement par les microorganismes (Louembé et *al.*, 2003 ; Sawadogo-Lingani et *al.*, 2008). Djouldé et *al.* (2003, 2005) ont également isolé des *Lactobacilli* de cossettes de manioc ayant une activité α -amylasique. Ils les ont utilisés comme ferment pour contrôler le rouissage et assurer une meilleure qualité des produits de transformation du manioc amer.

3- Conclusion partielle

Les profils physiologiques indiquent clairement une diversité de souches intervenant dans l'exploitation et le stockage du vin de palme. Cette diversité est plus marquée au niveau de l'exploitation où les récoltes sont indépendantes l'une de l'autre. Sur les 140 souches analysées par galerie API 50 CHL, les cinq (5) genres ont donné 15 espèces de *Lactobacillus* qui sont entre autres *Carnobacterium divergens*, *Weissella viridescens*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus damnosus* 2, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus brevis* 1, *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum* 2, *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus curvatus sp curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii sp delbrueckii*, *Pediococcus damnosus* 1, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Lactobacillus delbrueckii sp bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii sp lactis* 1.

Pendant l'exploitation du vin de palme les espèces prédominantes sont *Pediococcus pentosaceus* et *Lactobacillus pentosus* alors que pendant le stockage ce sont les espèces de *Lactobacillus delbrueckii sp bulgaricus* qui sont dominantes. Ces analyses montrent que pendant l'exploitation du vin de palme l'acidification est assurée par les espèces *Pediococcus pentosaceus* et *Lactobacillus pentosus* alors que pendant le stockage c'est l'espèce de *Lactobacillus delbrueckii sp bulgaricus* qui assurent l'acidification.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1- Conclusion générale

Ce travail de recherche s'est consacré à l'étude des bactéries lactiques isolées du vin de palme pendant l'exploitation et le stockage. Il s'est également intéressé à la connaissance des phénomènes biochimiques qui s'y déroulent. Les résultats de l'étude effectuée sur deux variétés (*Dura* et *Tenera*) de palmiers à huile (*Elaeis guineensis*) ont permis de comprendre que pendant l'exploitation, le vin de palme se caractérise par d'importantes modifications physico-chimiques et microbiologiques. La sève de la variété *Dura* contient un taux élevé de sucres (totaux et réducteurs) en début d'exploitation. Au cours de l'exploitation, les teneurs en sucres des vins de palme diminuent progressivement. Il en est de même pour le pH et la viscosité. Mais après 13 jours d'exploitation, la viscosité ne présente plus de différence significative entre les vins des deux variétés de palmiers. Néanmoins le vin de palme de la variété *Tenera* contient une teneur en vitamine C et une teneur en éthanol plus élevées par rapport au vin de palme de la variété *Dura*. Pendant que le taux de vitamine C diminue dans le vin du palmier *Tenera*, il augmente progressivement dans celui du palmier *Dura* au cours d'exploitation. La concentration en éthanol augmente progressivement dans les différents vins de palme.

Les différents vins de palme contiennent des charges élevées en microorganismes. En début d'exploitation, la charge de tous les microorganismes étudiés est faible dans le vin de palme de la variété *Dura* alors qu'elle est élevée dans le celui de la variété *Tenera*. La charge en GAM et en bactéries lactiques reste presque stable pendant l'exploitation. Les autres microorganismes tels que les levures, les Entérocoques, les coliformes (totaux et fécaux) et les sulfito-réducteurs restent élevés seulement dans le vin de palme de la variété *Tenera*. Les sulfito-réducteurs disparaissent après 3 jours d'exploitation dans les différents vins de palme quelque soit la variété du palmier.

Cette étude a révélé aussi la présence d'acides organiques en début et pendant l'exploitation. Pendant l'exploitation, les teneurs en acides lactique, malique, oxalique, citrique, fumarique, ascorbique et acétique sont plus élevés dans le vin de palme de la variété *Tenera* que dans le vin de palme de la variété *Dura*. Pendant que l'acide propionique a été détecté dans le vin de palme de la variété *Dura* après 13 jours d'exploitation, il est absent dans celui de la variété *Tenera*. Le vin de palme de la variété *Dura* pourrait être conseillé aux consommateurs car il contient un taux élevé de sucres, un pH élevé avec une faible charge en microorganismes.

Pendant le stockage, les paramètres physico-chimiques et microbiologiques du vin de palme connaissent des variations. Les microorganismes transforment les sucres en alcool avec

production de dioxyde de carbone (CO₂) et d'acides organiques. Les paramètres physico-chimiques tels que les sucres et le pH diminuent, mais l'acidité titrable et la teneur en vitamine C augmentent. Une maîtrise et une connaissance des germes contaminant le vin de palme permettraient d'éviter son altération rapide. Aussi, un contrôle hygiénique accentué sur les conditions d'exploitation pourrait réduire les souches pathogènes du vin de palme. Mais la présence d'une population importante de bactéries lactiques dans les différents vins de palme pourrait avoir un effet bénéfique sur la santé du consommateur et donc augmenter l'intérêt de cette boisson.

Le dénombrement de la flore fermentaire pendant le stockage du vin de palme a montré clairement que la fermentation lactique qui a lieu dans le vin de palme est une fermentation dominée par les *Lactobacilli* (52,86%). Les profils physiologiques indiquent une diversité de microorganismes intervenant dans l'exploitation et le stockage du vin de palme. Cette diversité est plus marquée au niveau de l'exploitation où les récoltes sont indépendantes l'une de l'autre. Les souches identifiées (140) par galerie API 50 CHL présentent cinq (5) genres avec 15 espèces de bactéries lactiques. Pendant l'exploitation du vin de palme les espèces prédominantes sont *Pediococcus pentosaceus* et *Lactobacillus pentosus* alors que pendant le stockage ce sont les espèces de *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* qui sont dominantes.

2- Perspectives

Pour conforter ces travaux et valider avec plus de force les résultats obtenus, il serait nécessaire de :

- parfaire l'identification des bactéries lactiques et constituer une banque de données qui pourraient être par la suite enregistrées dans la base de données internationale « Genbank », nous souhaiterons utiliser des méthodes de pointes telles que la PCR spécifique et le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16 S.
- caractériser les activités anti-bactériennes des souches ou espèces de bactéries lactiques les plus efficaces pour en faire de potentiels ferments qui serviront à améliorer la qualité nutritionnelle, microbiologique et sécuritaire d'autres aliments.
- évaluer les potentialités probiotiques de ces bactéries lactiques et leur effet bénéfique sur la santé.
- étudier les propriétés technologiques pour aider à mieux élucider la participation des microorganismes dans la sécurisation des différents vins de palme.

- initier des essais de fermentation en mono ou en co-culture en utilisant les souches sélectionnées associées aux souches qui possèdent des activités antibactériennes en vue de mettre en place un ferment pour des fermentations contrôlées du vin de palme pasteurisé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams M. R., Marteau P., (1995).** On the safety of lactic acid bacteria from food, *Int. J. Food Microbiol.* 2: 263-264.
- Adebayo-Tayo B. C., Onilude A. A., (2008).** On the safety of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Some Nigerian Fermented Foods for EPS Production. *World Appl. Sci. J.*, 4(5): 741-747.
- Aidoo K. E., Nout M. J. R., Sarkar P. K., (2006).** Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. *FEMS Y. Res.* 6: 30-39.
- Agati V., Guyot J. P., Morlon-guyot P., Tlamond P., Hounhouigan D. J., (1998).** Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin. *J. Appl. Microbiol.*, 85: 512-520.
- Aguirre M., Collins M. D., (1993).** Lactic acid bacteria and human clinical infection, *J. Appl. Bacteriol.* 75: 95-107.
- Aka J. P., Akassan Y. M., Alla M. T., Amian K. G. et Aminata B., (2008).** Phytotechnie spéciale du palmier à huile. Travaux de recherche en cultures pérennes. Ecole Supérieure d'Agronomie de Yamoussoukro / Côte d'Ivoire. 41p.
- Akalin A. S., Gönç S, Akbast Y., (2002).** Variation in organic acids content during ripening of pickled white cheese. *J. Dairy Sci.*, 85: 1670-1676.
- Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microb. Rev.* 59 : 143-169.
- Amárta F., Requena T., Taborda G., Amigo L., Pelaez C., (2001).** *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* initiate catabolism of methionine by transamination. *J. Appl. Microbiol.*, 90: 971-978.
- Amoa-Awua, W. K. A., Appoh F. W., Jakobsen M., 1996.** Lactic acid fermentation of cassava dough into afebelima. *Int. J. Food Microbiol.*, 31: 87-98.
- Amoa-awua W. K., Sampson E., Tano K. et Debrah (2007).** Growth of yeasts, lactic and acetic bacteria in palm wine during tapping and fermentation from felled oil palm (*Elaeis guineensis*) in Ghana. *J. Appl. Microbiol.* 47: 1-8.
- Ampe F., Sirvent A., Zakhia N., (2001).** Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *Int. J. Food Microbiol.*, 65: 45-54.
- Area, S.L., (1992).** Tapping Patterns of the Kitul Palm (*Caryota urens*) in the Sinharaja. *Principes.* 36: 28-33.

- Anonyme 1 (1987).** Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur. Microbiologie, immunologie, diagnostique Pasteur. 3^{ème} édition, Marnes-la-Coquette 728p.
- Anonyme, (1998).** Mémento de l'agronome. Ministère de la coopération et du développement. Collection « Techniques Rurales en Afrique » : pp 898-913.
- Anonyme, (2002).** Cultures spéciales, les plantes comestibles, les plantes oléifères, palmier à huile, Mémento de l'agronome [CD-ROM] (2002). Microsoft corporation.
- Assanvo J. B., Agbo G. N., Behi Y. E. N., Coulin P., Farah Z., (2006).** Microflora of traditional starter made from cassava for “attiéké” production in Dabou (Côte d'Ivoire). *Food Control*, 17 : 37-41.
- Assi C., (2003).** *Etude socio-économique et caractérisation génomique des levures isolées du “vin” de palme (bangui).* Mémoire de DEA. Université d'Abobo-Adjamé, Abidjan, Côte d'Ivoire: 45 p.
- Assiedu J. J., (1991).** La transformation de produits agricoles en zones tropicales. Approche technologique karthala et CTA, Paris ; p 242-246.
- Atacador-Ramos, M., (1996).** Indigenous Fermented Foods in Which Ethanol is a Major Product. *H. Indig. Ferment. Food, second ed.*, pp. 363-508.
- Atputharajah J. D., Widanapathirana S. and Samarajeewa U., (1986).** Microbiology and biochemistry of natural fermentation of coconut palm sap. *Food Microbiology* 3 (4): 273-280.
- Aurelie B., (2003).** Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approches physiologiques et génétiques. Thèse de Doctorat Unique. Université de Bordeaux 1.
- Axelsson L., (2004).** Classification and physiology : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. *Salsinen S., Wright A.V., Ouwehand A. 3e Ed. New York, Marcel Dekker, Inc., vol. 633: 1-66.*
- Awasum N. F., (2012).** The Emergence of Public Spheres in Colonial Cameroon: Palm Wine Drinking Joints in Bamenda Township. *Afr Dev*, 38: 69-84.
- Ayernor G. K. S. et Mathews J. S., (1971).** The sap of the palm *Elaeis guineensis* Jacq as raw material for alcoholic fermentation in Ghana. *Trop sci* 13: 71-83.
- Ayogu T. E., (1999).** Evaluation of the performance of a yeast isolate from Nigerian palm wine in wine production from pineapple fruits. *Biores. Technol.* 69 : 189-190.
- Babacar S., (2002).** Etude de la fermentation traditionnelle de cymbium pepo (mollusque, gasteropode) : caractérisation de la microflore et qualités organoleptiques du « yeet ». p 1-77.

- Baleiras Couto M. M., Eijmsa B., Hofstra H., Huis in't Veld J. H. J. et Van der Vossen J. M. B. M., (1996).** Evolution of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. and Env. Microbiol.* 62: 41-46.
- Baleiras Couto M. M., Vogels J. T. W. E., Hofstra H., Huis in't Veld J. H. J. et Van der Vossen, J. M. B. M., (1995).** Random Amplified Polymorphic DNA and Restriction Enzyme Analysis of PCR Amplified rDNA in Taxonomy: Two Identification Techniques for Food-Borne Yeasts' in *J. Appl. Bacteriol.* 79, 525-535.
- Baleiras Couto M. M., Van der Vossen J. M. B. M., Hofstra H. et Huis in't Veld, J. H. J., (1994).** RAPD analysis; a rapid technique for differentiation of spoilage yeast. *Int. J. Food Microbiol.*, 24: 249-260.
- Banquis A.C., Raynaud V., Le Tual A.G., Eppert I., Bercetche J.C., Roustan G., (2002).** Effet de combinaisons sélectionnées de cultures lactiques et de cultures d'affinage sur l'aspect et l'arôme de pâtes molles fleuries traditionnelles. *Sciences des Aliments*, 22 : 169-175.
- Barbonnelle B., Denis, Marmonier A., Pinon G. et Vargues R., (1987).** *Bactériologie Médicale : Techniques usuelles*. 2^{ème} tirage, Paris, France, 65p.
- Bassir O., (1962).** Observation on the fermentation of palm wine West African *J. boil. Chem*, 6: 2-20.
- Bassir O., (1968).** Some Nigeria palm wines. West African *J. boil. Chem*, 10: 42-45.
- Bazarre T. L., Wu L., Yuhas J. A., (1983).** Total and HDL-cholesterol concentrations following yogurt and calcium supplementation, *Nutr. Rep. Int.* 28: 1225-1232.
- Ben Omar N., Abriouel H., Keleke S., Valenzuela A. S., Martínez-Cañamero M., López R. L., Ortega E., Gálvez A., (2008).** Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from pototo, a congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *Int. J. Food Microbiol.*, 127: 18-25.
- Ben Amor K., Vaughan E. E. et De Vos W. M., (2007).** Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *J. Nutr.* 741S-747S.
- Ben Omar N., Ampe F., (2000).** Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(9): 3664-3673.
- Bergqvist S.W., Sandberg A.S., Carlsson N.G., Andlid T., (2005).** Improved iron solubility in carrot juice fermented by homo and heterofermentative lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, 22: 53-61.
- Bernfeld D., (1955).** Analyse β et α , in methods in enzymology 1, S. P. Colowick end N. O. K., *Academyc press, Inc, New York*, 149-154.

- Berthier F. et Ehrlich S. D., (1999).** Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 997-1007.
- Beuchat L. R., (1995).** Indigenous fermented foods. In : Rehm H.-J., Reed G., Puhler A. Studler P. (Eds.), *Biotechnology. Verlag Chemie : Weinheim*, 550-559.
- Blandino A., Al-Aseeri M. E., Pandiella S. S., Cantero D. and Webb C., (2003).** Cereal-based fermented food and beverages. *Food Res. Int.*, 36: 527-543.
- Björkroth J. et Korkeala H., (1996).** rRNA gene restriction patterns as a characterisation tool for *Lactobacillus sake* producing ropy slime. *Int. J. Food Microbiol.* 30: 293-302.
- Borch E., Nerbrink E., Svensson P., (1988).** Identification of major contamination sources during processing of emulsion sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 7: 317-330.
- Borgen K., Wasteson Y., Kruse H. et Willems R. J., (2002).** Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) from Norwegian poultry cluster with VREF from poultry from the United Kingdom and The Netherlands in an amplified fragment length polymorphism genogroup. *Appl. Env. Microbiol.* 68: 3133-3137.
- Borse B. B., Rao J. L., Ramalakshmi K. et Raghavan B., (2007).** Chemical composition of volatiles from coconut sap (neera) and effect of processing. *Food Chemistry.* 101, 877-880.
- Botstein D., White R. L., Skolnick M. et Davis R. W., (1980).** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics.* 32: 314-331.
- Bouix et Leveau J.Y. (1993).** Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Edition technique et documentation Lavoisier, ISBN : 2-85206-850-8 ; p. 612.
- Bourgeois C. M. et Mafart P., (1996).** La brasserie. In: Bourgeois CM, Larpent JP (eds) Microbiologie alimentaire: aliments fermentés et fermentation alimentaire. Technique et Documentation-Lavoisier, Paris, pp 91-109.
- Bourgeois C. M. et Leveau J. Y., (1991).** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Tome 3 : le contrôle microbiologique. Edition Lavoisier et Apria, Paris, 451p.
- Bringel F., Curk M-C., Hubert J-C., (1996).** Characterization of *Lactobacilli* by Southern-Type Hybridization with a *Lactobacillus plantarum* pyrDFE Probe. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46(2): 588-594.
- Brul S. et Coote P., (1999).** Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanism. *Int. J. Food Microbiol.*, 50: 1-17.

- Bruinsma N., Willems R. J., Van Den Bogaard A. E., Van Santen-Verheuevel M., London N., Driessen C. et Stobberingh E. E., (2002).** Different levels of genetic homogeneity in vancomycin- resistant and -susceptible *Enterococcus faecium* isolates from different human and animal sources analyzed by amplified fragment length polymorphism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2779-2783.
- Buettner A., (2004).** Investigation of potent odorants and after odour development in two chardonnay wines using the buccal odour screening system (BOSS). *J. Agr. and Food Chem.*, 52: 2339-2346.
- Buettner A., et Schieberle P., (2001).** Evaluation of key aroma compounds in hand-squeezed grapefruit juice (*Citrus paradise* Macfayden) by quantitation and flavor reconstitution experiments. *J. Agr. and Food Chem.*, 49: 1358-1363.
- Bukowska H., Pieczul-Mroz J., Jastrze B. M., Chelstowski K., Naruszewicz M., (1998).** Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis*, 137: 437-438.
- Chandrasekhar K., Sreevani S., Seshapani P., Pramodhakumari J., (2012).** A Review on palm wine. *Int. J. Res. in Biol. Sc.*, 2 (1): 33-38
- Cenatiempo Y., Berjeaud J.M., Biet F., Fremaux C., Hechard Y., Robichon D., (1996).** Bacteriocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d'actions et leurs déterminants génétiques. *Lait*, 76 : 169-177.
- Cameron J.R., Loh E.Y. et Davis R.W., (1979).** Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell*, 16: 739-751.
- Caplice E., Fitzgerald G. F., (1999).** Food fermentations, role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50: 131-149.
- Cleveland J., Montville T., Nes F. et Chikindas L., (2001).** Bacteriocins safe natural antimicrobial of food preservation. *Inter. J. Food Microbiol.* 71: 1-20.
- Cocconcelli P. S., Porro D., Galandini S. et Senini L., (1995).** Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 376-379.
- Cœuret V., Dubernet S., Bernadeau M., Gueguen M. and Vernoux J. P., (2003).** Isolation, characterisation and identification of *Lactobacilli* focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, 83: 269-306.

- Collins M. D., Samelis J., Metaxopoulos J. et Wallbanks S., (1993).** Taxonomic studies of some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* vol. 75: 595-603.
- Collins J., (1989).** The early history of West African highlife music. *Popular Music*, 8: 221-230.
- Collins M. D., Farrow J. A. E., Phillips B. A., Feresu S., Jones D., (1987).** *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 220-223.
- Conner H. A., Allgier F. J., (1976).** Vinegar: Its history and development. *Adv Applied Micro.* 20: 81-133.
- Constantí M., Reguant C., Poblet M., Zamora F., Mas A., Guillamón J.M., (1998).** Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 41: 169-175.
- Cunningham A. B., (1990).** Income, sap yield and effects of sap tapping on palms in south-eastern Africa. *S. Afr. J. Bot.* 56(2): 137-144.
- Curk M. C., Peladan F., Hubert J. C., (1993).** Caractérisation biochimique des *Lactobacilles* brassicoles. *Lait*, 73: 215-231.
- Dambekodi P. C., Gilliland S. E., (1998).** Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.*, 81: 1818-1824.
- Dayo-Owoyemi, I., Boboye, B. and Akinyosoye, F.A., (2008).** Organoleptic Analysis of Doughs Fermented with Yeasts From A Nigerian Palm Wine (*Elaeis guineensis*) and Certain Commercial Yeasts. *J. O. Microbiol.*, 2 : 115-120.
- De Barros Lopes M., Soden A., Martens A.L., Henschke P.A., et Langridge P., (1998).** Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 279-286.
- De Barros Lopes M., Soden A., Henschke P.A., et Langridge P., (1996).** PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. and Env. Microbiol.*, 62: 4514-4520.
- De Man J. C., Rogosa M. et Sharpe M. E., (1960).** Medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 130-138
- Descheemaeker P., Lammens C., Pot B., Vandamme P. et Goossens H., (1997).** Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 555-561.

- Desmazeaud M., (1996).** Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : Utilisation et innocuité. Cahiers « agricultures » 5, p 331-342.
- Diduk S., (1993).** European alcohol, history and the state in Cameroon. *African Studies Review*, 36: 1-42.
- Diep D. B., et Nes F. I., (2002).** Ribosomal synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets*, 3 : 107-122.
- Djouldé D. R., Etoa F. X., Essia Ngang J. J., Mbofung C. M. F., (2005).** Screening des microorganismes à potentialités fermentaires pour le manioc. *Tropicultura*, 23: 11-18.
- Djouldé D. R., Etoa F. X., Essia Ngang J. J., Mbofung C. M. F., (2003).** Fermentation du manioc cyanogène par une culture mixte de *Lactobacillus plantarum* et *rhizopus oryzae*. *Micro. Hyg. Ali.* 15 : 101-117.
- Drouault S., Corthier G., (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France. 32 : 101-117.
- Dubois M., Gilles K. , Hamilton J. K. , Rebers P. A. et Smith F., (1956).** Colometric method for determinations of sugars and related substances. *Anal. Chem.* , 280: 350-356.
- Du Plessis E. M. et Dicks L. M. T., (1995).** Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)- PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amyglovorus*, *L. gallinarum*, *L. grasseri* and *L. johnsonii*. *Curr. Microbiol.* 31: 114-118.
- Dykes G. A. et von Holy A., (1994).** Strain typing in the genus *Lactobacillus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 19: 63-66.
- Ehrmann M. A., Müller M. R. A., Vogel R. F., (2003).** Molecular analysis of sourdough reveals *Lactobacillus mindensis* sp. nov. *Int. Syst. Evolut. Microbiol.*, 53(1): 7-13.
- Ejiofor A. O., Okafor N., Ugwueze E. N., (1994).** Development of baking yeast from Nigerian palm wine yeast. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 199-202.
- Elmer G. W., Surawicz C. M., McFarland L. V., (1996).** Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infection, *J. Am. Med. Assoc.* 275: 870-876.
- Ercolini D., (2004).** PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Meth.* 56: 297-314.
- Eschenbach D., Davick P., Williams B., Klebanoff S., Young-Smith K., Citchlow C., Holmes K., (1989).** Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J. Clinical Microbiol.*, 27: 151-256.

- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol A., (1999).** Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 : 329-337.
- Ezeagu I. E., et Fafunso M. A., (2003).** Biochemical constituents of palm wine. *Ecology Food Nutr*, 42: 213-222.
- FAO., (1998).** Fermented fruits and vegetables. A global perspective. Agricultural Services Bulletin. *Food and Agricultural Organization*.
- Faparusi S. I. (1973).** Origin of Initial Microflora of Palm Wine from Oil Palm Trees (*Ekaeis guineensis*). *J. appl. Bad.* 36: 559-565.
- Faparusi I. et Bassir O., (1972).** Factors affecting the quality of palm wine. I. Period of tapping a palm tree. *West Afr. J. Biol. Appl. Chem.* 15, 17.
- Farrow J. A. E., Facklam R. R., Collins M. D., (1989).** Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant *Leuconostoc* and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39: 279-283.
- Ferreira V., Ortin N., Escudero A., Lopez R., Cacho J., (2002).** Chemical characterization of the aroma of Grenache rose wines: aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies. *J. Agr. and Food Chem.*, 50 (14): 40: 48-54.
- Food and Agriculture Organization (FAO) (1998).** Fermented fruits and vegetables. A global perspective. Agricultural services Bulletin of food and Agricultural Organization, 134.
- Frezier, V., Dubourdieu, D., (1992).** Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. and Viticul.*, 43: 375-380.
- Gallego F. J., Perez M. A., Martinez I. et Hidalgo P., (1998).** Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Am. J. Enol. and Viticul.*, 43: 375-380.
- Gancheva A., Pot B., Vanhonacker K., Hoste B. et Kersters K., (1999).** A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and related species. *Syst. Appl. Microbiol.* 22(4):573-585.
- Gasser F., (1993).** Cours international de microbiologie des aliments: les bactéries lactiques. Unité de lait et de produits laitiers.
- Gevers D., (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.
- Gevers D., Huys G. et Swings J., (2001).** Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 31-36.

- Gibson G. R., Roberfroid M. B., (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401-1412.
- Gilliland S. E., (1990).** Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 175-188.
- Gobbetti M., Corsetti A., De Vincenzi S., (1995).** The sourdough microflora. Characterization of hetero-fermentative lactic acid bacteria based on acidification kinetics and impedance test. *Ital. J. Food Sci.* 2: 103-113.
- Gobbetti M., Corsetti A., Rossi, J., (1994).** The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 456-460.
- Gotcheva V., Pandiella S. S., Angelov A., Roshkova Z. et Webb C., (2001).** Monitoring the fermentation of the traditional Bulgarian beverage boza. *Int. J. Food Sc. and Technol.*, 36: 129-134
- Granchi L., Bosco M., Messini A. et Vincenzini M., (1999).** Rapid detection and quantification of the yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 949-956.
- Greenwalt C. J., Ledford R. A., Steinkraus K. H., (2000).** Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *J. Food Protect.*, 63: 976-981.
- Greenwalt C. J., Ledford R. A., Steinkraus K. H., (1998).** Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *Lebensm.-Wiss u. Technol.* 31: 291-296.
- Guarner F., Malagelada J. R., (2003).** Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361: 512-519.
- Guenier A. S., Caillet S., Ouattara B., Laleye L., Lacroix M., (2010).** Antibacterial capacity of a reconstituted fortified beverage used as a nutritional supplement. Institut Armand-Frappier, *Res. Lab. in Sc. Appl. to Food*, 531, p. 1-8.
- Guarneri T., Rossetti L., Giraffa G., (2001).** Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33: 377-381.
- Guiraud J. P., (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod-RIA., 696.
- Guiraud E., Champailier A., Moulard S. and Raimbault M., (1998).** Development of a miniaturized selective counting strategy of lactic acid bacteria for evaluation mixed starter in a model cassava fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 84: 444-450.
- Guiraud J. et Galgy P., (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Collection Génie Alimentaire, les éditions l'usine Nouvelle, Paris. 236p.

- Gutell R. R., Larsen N. et Woese C. R., (1994).** Lessons from an evolving rRNA; 16S and 23S rRNA structures from a comparative. *Microbiol. Rev.*, 58: 10-26.
- Güzel-Seydium Z. B., Seydium A. C., Greene A. K., Bodine A. B., (2000).** Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation . *J. Food Comp. Anal.*, 13: 35-43.
- Hagen B. F., Næs H., Holck A. L., (2000).** Meat starters have individual requirements for Mn²⁺. *Meat Sci. vol.* 55: 161-168.
- Halliwell B., (1987).** Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid: Implications for antioxidant protection in the inflamed rheumatoid joint. *FEBS Lett.*, 213: 15-17.
- Hammes W. P., Hertel C., (1998).** New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.* 49 (Suppl. 1), S125-S138.
- Hammes W. P., Vogel R. F., (1990).** Gentechnik zur Modifizierung von Starterorganismen. *Lebensmitteltechnik* 1-2, 24-32.
- Hansen A., Hansen B., (1996).** Flavour of sourdough wheat crumb. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 202: 244-249.
- Head, I. M., Saunders, J. R., Pickup, R. W., (1997).** Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganism. *Microbiol. Ecol.* 35 : 1-21.
- Heller R., (1981).** Reactions obscures et syntheses carbonées. In : Masson (ed). *Abrégé de physiologie végétale. Nutrition* Volume 1 ; 2eme édition Masson, Paris, p. 183-205.
- Hemila H., (1997).** Vitamin C intake and susceptibility to the common cold. *Br. J. Nutr.*, 77: 59-72.
- Hepner G., Fried R., StJeor S., Fusetti L., Morin R., (1979).** Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk, *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 19-24.
- Hestot H., Ladescu V.B., Krautter M., (1994).** La levure dans les industries alimentaires. Lavoisier Tec et DOC., 57p.
- Heyndrickx M., Herman L., Vlaes L., Butzler J. P., Wildemauwe C., Godard C., et De Zutter L., (2007).** Multiple Typing for the Epidemiological Study of the Contamination of Broilers with *Salmonella* from the Hatchery to the Slaughterhouse. *J. Food Protect.* 70: 323-334.
- Hicks R. E., Amann R. I. et Stahl D. A., (1992).** Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Appl. and Env. Microbiol.* 58: 2158-2163.

- Ho Thi Nguyet Thu, (2008).** Etude de la flore lactique du nem chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. Thèse de Doctorat Unique, Université bordeaux 1.
- Holzapfel W. H., (2002).** Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.*, 75: 197-212. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00707-3.
- Holzapfel W. H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. and Schillinger U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 365S-73S.
- Hulton C. S. J., Higgins C. F. et Sharp P. M., (1991).** ERIC sequences: a novel family of repetitive elements I the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5 : 825-834.
- Isolauri E., Salminen S., Ouwehand A. C., (2004).** Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Best Pract Res. Clin. Gastroenterol.*, 18 : 299-313.
- Isolauri E., Kirjavainen P. V., Salminen S., (2002).** Probiotics : a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut*, 50: 54-59.
- Jacquain-Goldsmit E. et Daras-Lhoir G., (1984).** Une méthode rapide pour le dénombrement de la flore lactique spécifique du Yaourt. *Rev. Des fermentations et des industries alimentaires.* 39: 9-11.
- Jacquemard J.C., (1995).** Le palmier à huile, Technicien de l'agriculture tropicale. 207p.
- Janssen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Bleeker M., Vos P., Zabeau M. and Kersters K., (1996).** valuation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiol.* 142: 1881-1893.
- Jespersen L., (2003).** Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Res.* 3: 191-200.
- Jiang T., Mustapha A., Savaiano D. A., (1996).** Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.*, 79: 750-757.
- Jirovetz L., Buchbauer G., Fleischhacker W., and Ngassoum M. B., (2001).** Analysis of the aroma compounds of two different palm wine species (“Matango and Raffia”) from Cameroon using SPME-GC-FID, SPME-GC-MS & olfactometry. *Erna` hrung /Nutrition*, 25(2): 67-71.

- Jitbunjerdkul S., (1989).** Effect of antimicrobial agents on the quality of palm sugar products. Songklanakarin. *J. Sci. and Technol.*, 11: 161-165.
- Johansson M. L., Quednau M., Molin G. et Ahrné S., (1995b).** Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 155-159
- Johansson M. L., Molin G., Petersson B., Uhlén M. et Ahrné S., (1995a).** Characterization and species recognition of *Lactobacillus plantarum* strains by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of the 16S rRNA gene. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 536-541.
- Kandler O. and Weiss, N., (1986).** Genus *Lactobacillus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. II ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. pp. 1209–1234. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Kanwar S. S. et Kalia A. K., (1993).** Anaerobic fermentation of sheep droppings for biogas production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9: 174-175.
- Karaoğlu A. S., Aydin F., Killi S. S., Kiliç A. O., (2003).** Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal *Lactobacilli*. *Turk. J. Med. Sci.*, 33: 7-13.
- Karadeniz F., (2004).** Main organic acid distribution of authentic citrus juices in Turkey. *Turk. J. Agric. For.*, 28: 267-271.
- Karamoko D., Djeni N. T., N'guessan K. F., Bouatenin K. M. J-P. and Dje K. M., (2012).** The biochemical and microbiological quality of palm wine samples produced at different periods during tapping and changes which occurred during their storage. *Food Control.* 26: 504-511.
- Khaled Daud A. K., Neilan B. A., Henriksson A. et Conway P. L., (1997).** Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 53: 191-197.
- Kieronczyk A., Skeie S., Langsrud T., Le Bars D., Yvon M., (2004).** The nature of aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids. *Int. Dairy J.*, 14: 227-235.
- Kimmons J. E., Brown K. H., Lartey A., Collison E., Mensah P. P., Dewey K. G., (1999).** The effects of fermentation and/or vacuum flask storage on the presence of coliforms in complementary foods prepared in Ghana. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 50: 195-201.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G., (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 41: 103-125.

- Kostinek M., Specht I., Edward V. A., Schillinger U., Hertel C., Holzapfel W. H., Franz C. M. A. P., (2005).** Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Syst. Appl. Microbiol.*, 28: 527-540.
- Kreger-van Rij, N. J. W., (1984).** In: Kreger-van Rij, N.J.W. (Ed.), The Yeasts-A Taxonomic Study, 3rd ed. Elsevier Science Publisher, Amsterdam. *Int. J. Food Microbiol.* 26: 251-275.
- Krieg N. R., (2001).** The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria - Identification of procaryotes. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Garrity G. M., Boone D. R., Castenholz R. W. Williams and Wilkins, Baltimore., 721: 33-38.
- Kunéné N. F., Geonaras I., Holy A. V., Hastings J. W., (2000).** Characterization and determination of origin of Lactic Acid Bacteria from sorghum-based fermented weaning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Env. Microbiol.*, 66(3): 1084-1092.
- Kurtzman C. P., Boekhout T., Robert V., Fell J. W. et Deak T., (2003).** Methods to identify yeasts. In: *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects*. Boekhout T., Robert V., Phaff H. (eds), Boca Raton, CRC press, pp. 69-121.
- Kurtzman C. P., Fell J. W., (1998).** The Yeasts, A Taxonomic Study, 4th ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 77-100.
- Labioui L., Elmoualdi L., El Yachioui M., Oushssine M., (2005).** Selection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 144: 237-250.
- Lambert R. J., Stratford M., (1999).** Weak-acid preservatives: modeling microbial inhibition and response. *J. Appl. Microbiol.*, 86 : 157-164.
- Larpent J. P., (1991).** Les ferments microbiens dans les industries agro alimentaires (produits laitiers et carnés). Ministère de l'agriculture, centre de documentation international des industries des produits agricoles (CDIUPA), Tec. et Doc., p. 242.
- Larpent J. P. et Larpent-Gourgaud M., (1990).** *Memento technique de microbiologie*, 2^{ème} édition. Technique et documentation-Lavoisier, France, 417p.
- Lasekan O., Buettner A. et Christlbaure M., (2007).** Investigation of important odorant of palm wine (*Elaeis guineensis*). *Food Chem.*, 105:15-23.
- Las Heras-Vazquez F. J., Mingorance-Cazorla L., Clemente-Jimenez J. M. et Rodriguez-Vico F., (2003).** Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research*. 3: 3-9.

- Law S. V., Abu Bakar F., Mat Hashim D. and Abdul Hamid A., (2011).** Popular fermented foods and beverages in Southeast Asia. *Int. Food Res. J.* 18: 475-484
- Lebbie A. R., Guries R. P., (2002).** The Palm Wine Trade in Freetown, Sierra Leone: Production, Income, and Social Construction. *Econ Bot*, 56: 246-54.
- Le coq Raoul, (1965).** Manuels d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles. Tome Edition Dion. P 695.
- Legras J. L., Karst F., (2003).** Optimisation of inter-d analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 221 : 249-255.
- Le Marrec C., Hyronimus B., Bressollier P., Verneuil B. et Urdaci M.C., (2000).** Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* 14. *Appl. Env. Microbiol.* 66 : 5213-5220.
- Lepargneur J., Rousseau V., (2002).** Rôle protecteur de la flore de Doderlein. *J. Gynecol. Obstét. Biol. Repro.*, 31: 485-494.
- Leroy F. and De Vuyst L., (2004).** Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry, *Trends Food Sci. Technol.* 15: 67-78.
- Limsowtin G. K. Y., Broome M. C., Powell I. B., (2004).** Lactic acid bacteria, taxonomy. Encyclopedia of Dairy Sciences. Roginski H. Oxford, Elsevier.1470-1478.
- Lindsay R. C., (1996).** Flavors. In nneMaFe, O. R. (Eds). *Food Chem.*, P. 723-765. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Llaurado J. M., (2002).** *Avaluació dels condicionants del most en el desenvolupament de la fermentació alcohòlica a baixes temperatures.* Thèse, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Espagne.
- Louembé D., Kéléké S., Kobawila S. C., Nzouzi J. P., (2003).** Bactéries lactiques de la pâte fermentée de maïs au Congo. *Trop.*, 21(1) : 3-9.
- Loureiro V., et Malfeito-Ferreira M., (2003).** Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.*, 86: 23-50.
- Ludwig W., Schleifer K-H., Whitman W. B., (2008).** vol. 3. Bergey's taxonomic outlines Revised Road Map to the Phylum Firmicutes. P: 45-50.
- Lupski J. R. et Weinstock G. M., (1992).** Short interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174 : 4525-4529.
- Lyhs U., Bjorkroth J. et Korkeala H. (1999).** Characterisation of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.* 52 : 77-84.

- Macfarlane S., Macfarlane G.T., (2003).** Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.*, 62: 67-72.
- Mannu L., Comunian R., Scintu M. F., (2000).** Mesophilic Lactobacilli in Fiore Sardo cheese : PCR-identification and evolution during cheese ripening. *Inst Dairy J.*, 10: 383-389.
- Marzia S., Francesca C., Manuela T., Maurizio C., (2009).** Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food Microbiol.* 26: 415-420
- Masha G. G. K., Ipsen M. A., Petersen M. A., Jakobsen M., (1998).** Microbiological, rheological and aromatic characteristics of fermented uji (an East African sour porridge). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 451-456.
- Masneuf I. et Dubourdieu D., (1994).** Comparaison de deux techniques d'identification des souches de levures de vinification basées sur le polymorphisme de l'ADN génomique : réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analyse des caryotypes (électrophorèse en champ pulsé). *Journal de l'institut des Sciences des Vignes et Vin*, 28 : 153-160.
- Masschelein C. A., (1979).** Developpement recents en biochimie industrielle. Rev. Des fermentations et des industries alimentaires. 34 : 183-188.
- Matthias M., (1999).** L'utilisation durable des palmiers *Borassus aethiopum*, *Elaeis guineensis* et *Raphia hookeri* pour l'extraction de vin de palme en Côte d'Ivoire. Recherche sur la forêt tropicale. P : 1-83.
- Mbuagbaw L., Noorduyn S., (2012).** The Palm Wine Trade: Occupational and health hazards. *Int. J. Occup. and Env. Med.*, 3: 157-164.
- McCartney A. L., (2002).** Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British J. Nutr.* 88(Suppl. 1): S29-S37.
- Meignen B., Onno B., Gelinas P., Infantes M., Guilois S., Cahagnier B., (2001).** Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. *Food Microbiol.*, 18: 239-245.
- Mensah P., Tomkins A. M., Drasar B. S., Harrison T. J., (1990).** Fermentation of cereals for reduction of bacterial contamination of weaning foods in Ghana. *Lancet*, 336: 140-143.
- Merican Z., Yeoh Q. L., (1989).** Tapai Processing in Malaysia. In: Steinkraus KH, editor. Industrialization of Indigenous Fermented Foods. New York, NY: Marcel Dekker. P 169-190.
- Metchnikoff E., (1907).** In the prolongation of life: optimistic studies, in: Chalmers M. (Eds.), William Heinemann, London, *Food Sci. Nutr.* 38: 13-126.
- Moll G. N., Konings W. N., Driessen A. J. M., (1999).** Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation, *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185-198.

- Molnár O., Messner R., Prillinger H., Stahl U. et Slavikova E., (1995).** Genotypic identification of *Saccharomyces* species using random amplified polymorphic DNA analysis. *Syst. and Appl. Microbiol.*, 18: 136-145.
- Moore W. E. C., Holdeman L. V., (1974).** Human faecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.*, 27: 961-979.
- Moschetti G., Blaiotta G., Villani F., Coppola S. et Parente E., (2001).** Comparison of statistical methods for identification of *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* from randomly amplified polymorphic DNA patterns. *Appl. Env. Microbiol.* 67: 2156-2166.
- Mosha D., Wangabo J., Mhinzi G., (1996).** African traditional brews: how safe are they, *Food Chem*, 57: 205-209.
- Motarjemi Y., (2002).** Impact of small-scale fermentation technology on food safety in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.*, 75: 213-229. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00709-7.
- Murray B. E., (1990).** The life and Time of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 3: 46-47.
- Naidu A. S., Bidlack W. R., Clemens R. A., (1999).** Probiotic spectra of lactic acid bacteria, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38: 13-126.
- Naknean P., Meenune M., Roudaut G., (2010).** Characterization of palm sap harvested in Songkhla province, Southern Thailand. *Int. Food Res. J.*, 17: 977-986.
- Nanadoum M., Mbaiguinam M., Gaillardin C., Pourquoi J., (2006).** Suivi technologique, analytique et microbiologique de la “bili bili”, bière traditionnelle tchadienne. *Afrique Science*, 02 : 69-82.
- Ness F., LLaVallee F., Dubourdiou D., Aigle M. et Dulau L., (1993).** Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.*, 62: 89-94.
- N’guessan K. F., (2009).** Analyse de quelques paramètres de la fermentation alcoolique conduisant au tchapalo (bière traditionnelle à base de sorgho) et des potentialités à la formulation d’une culture starter à partir de levures isolées. Thèse de Doctorat Unique, Université Abobo-Adjamé.
- N’Guessan K. F., Djeni N. T., Dadie A. T., Djè K. M., (2008).** Influence of Alcoholic Fermentation Temperature on Sorghum Beer Quality. *Food Global Science Books* (p. 1-5).
- Nielsen D. S., Jacobsen T., Jespersen L., Koch A. G., Arneborg N., (2008).** Occurrence and growth of yeasts in processed meat products - Implications for potential spoilage. *Meat Science. vol.* 80: 919-926.

- Nigatu A., Ahrne S. et Molin G., (2001).** Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles for the distinction of *Lactobacillus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 79:1-6.
- Noh D. O., Kim S. H., Gilliland S. E., (1997).** Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121, *J. Dairy Sci.* 80: 107-113.
- Noll R. G., (2008).** The wines of West Africa: History, technology and tasting notes. *J. Wine Econ.* 3: 85- 94.
- Nout M. J. R., Rombouts F. M., Havelaar A., (1989).** Effect of natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 8: 351-361.
- Nwachukwu I. N., Ibekwe V. I., Nwabueze R. N., Anyanwu B. N., (2006).** Characterisation of palm wine yeast isolates for industrial utilisation. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 1725-1728.
- Obire O., (2005).** Activity of yeast species in palm sap obtained from three areas in Edo state, Nigeria. *J. Appl. Sci. Env. Manag.* 9: 25-30.
- Odunfa, S.A., Oyewole, O.B., (1998).** African fermented foods. *Microbiol. Ferment. Foods* 2, 713–752.
- Odunfa S. A., (1985).** African Fermented Foods. In microbiology of fermented food. Elsevier *Appl. Sci. Publi., UK.*
- Ogbulie T. E., Ogbulie J. N. and Njoku H. O., (2007).** Comparative study on the shelf Life stability of palm wine from *Elaeis guineensis* and *Raphia hookeri* obtained from okigwe, Nigeria. *Afri. J. Biotechnol.* 6: 914-22.
- Oguntoyinbo F. A., (2007).** Identification and functional properties of dominant lactic acid bacteria isolated at different stages of a solid state fermentation of cassava during traditional gari' production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 1425-1432.
- Okafor N., (1978).** Microbiology and biochemistry of oil palm wine. *Advan. Appl. Microbiol.*, 24: 237-256.
- Okafor N., (1975).** Palm wine yeasts from parts of Nigeria. *J Sci Food Agric* 23, 1399-1407.
- Olasupo N. A., Obayori O. S., (2003).** Utilization of palm wine (*Elaeis guineensis*) for the improved production of Nigerian indigenous alcoholic drink, Ogogoro. *J. Food Process. Preserv.* 27, 365–372.
- Olasupo N. A., Olukoya D. K., (1996).** Odunfa S.A. Studies on local strains of amylolytic *Lactobacillus* from Nigerian fermented foods. *Nahrung*, 40: S. 44-46.
- Olusegun L., Andrea B., Monika C., (2007).** Investigation of important odorants of palm wine (*Elaeis guineensis*). *J. Food Chem.* 105: 15-23.

- Orla-Jensen A. D., (1919).** The lactic acid bacteria. Andr Fred Host and Son, Copenhagen 2: 27-36.
- Osuwa J. C. et Mbamara S. U., (2008).** Viscosities of palm oil and palm wine as quality indicators. *J. Food Technol.* 6: 170-172.
- Oyewole O. B., Odunfa S. A., (1990).** Characterization and distribution of Lactic Acid Bacteria in cassava fermentation during fufu production. *J. Appl. Bactereiol.*, 68: 145-152.
- Patrignani F., Lanciotti R., Mathara J. M., Guerzoni M. E. and Holzapfel W. H., (2006).** Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks, *Int. J. Food Microbiol.* 107: 1-11
- Paul H., (1970).** Le palmier à huile, Recueil de fiches techniques d'agriculture spéciale. Tome 1, pp 181-203.
- Pearson B. M. et Mckee R.A., (1992).** Rapid identification of *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *Int. J. Food Microbiol.*, 16: 63-67.
- Périsse J., Adrian J., Rérat A. et Le Berre S., (1959).** Bilan nutritif de la transformation du sorgho en bière ; préparation, composition, consommation d'une bière au Togo. *Annales de Nutrition et des Aliments*, XIII, 1-15.
- Pol, D., (1996).** Travaux pratiques des biologies des levures. Ellipses Edition Marketing, Paris, France, pp : 72-73. ISBN : 2-7298-5668-4.
- Pramateftaki P.V., Lanaridis P. et Typas M.A., (2002).** Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing of Greece. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 236-248.
- Presser K. A., Ratkowsky D. A., Ross T., (1997).** Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2355-2360.
- Querol, A., Barrio, E., Ramo'n, D., (1992).** A comparative study of different methods of yeast strain characterisation. *Syst. and Appl. Microbiol.* 15: 439-446.
- Quesada M.P. et Cenis J.L., (1995).** Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. *Am. J. Enol. and Viticul.*, 46: 204-208.
- Rainieri S., Zambonelli C. et Kaneko Y., (2003).** *Saccharomyces sensu stricto* : systematics, genetic diversity and evolution. *J. Biosci. and Bioengin.* 96: 1-9.
- Raimbault M., (1995).** Importance des bactéries lactiques dans les fermentations du manioc. In : Agbor Egbe T., Agbor E., Brauman A., Griffon D., Trèche S. (ed.). *Transformation alimentaire du manioc = Cassava food processing*. Paris : ORSTOM p. 259-275.
- Rappe M. S., Giovannini S. J., (2003).** The uncultured microbial majority. *Ann. Rev. Microbiol.* 57: 369-394.

- Rastall R. A., (2004).** Bacteria in the gut : Friends and foes and how to alter the balance. *J. Nutr.*, 134: 2022-2026.
- Rodtong S. et Tannock G. W., (1993).** Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Appl. Env. Microbiol.* 59: 3480-3484.
- Roe A. J., Mclaggan D., Dvidson I., O'byrne C., Booth I. R., (1998).** Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *J. Bacteriol.*, 180: 767-772.
- Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M. et Capece A., (2003).** Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169-180.
- Rongier J., (2004).** Les Ewe de Kouma us et coutumes. *Edition Harmattan.* P.79-81
- Rosenfeldt V., Benfeldt E., Valerius N.H., Paerregaard A., Michaelsen K.F., (2004).** Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J. Pediatr.*, 145: 612-616.
- Ross R. P., Morgan S. et Hill C., (2002).** Preservation and fermentation: Past, present and future. *International J. Food Microbiol.*, 79: 3-16.
- Rossello-Mora R. et Amann R., (2001).** The Species Concept for Prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 39-67.
- Rossouw J. E., Burger E., Ven der Vyer P., Ferreira J. J., (1981).** The effect of skim milk, yaourt and full cream on human serum lipids. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34: 351-356.
- Roussel Y., Colmin C., Simonet, J. M. et Decaris B., (1993).** Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen and Mocquot). *J. Appl. Bacteriol.* 74: 549-556.
- Sachindra N. M., Sakhare P. Z., Yashoda K. P., Narasimha Rao D., (2005).** Microbial profile of buffalo sausage during processing and storage. *Food Control.* vol. 16: 31-35.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. et Sakomoto K., Margolles A., Van Veen H. W., Konings W. N., (2001).** Hop Resistance in the Beer Spoilage Bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-Binding Cassette Multidrug Transporter HorA. *J. Bacteriol.*, 183(18): 5371-5375.
- Sambou B., Goudiaby A., Daouda D., Ervik, F. and Camara M. C., (2002).** Palm wine harvesting by the Bassari threatens *Borassus aethiopum* populations in north-western Guinea. *Biodiver. and Conser.* 11: 1149-1161.

- Sanni A. I., Morlon-Guyot J., Guyot J. P., (2002).** New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 72: 53-62.
- Sanni A. I., Onilude A. A., Ogunbanwo S. T., Smith S. I., (1999).** Antagonistic activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* species from ogi, an indigenous fermented food. *J. Basic. Microbiol.* 39 (3): 189-195.
- Sánchez I., Palop L., Ballesteros C., (2000).** Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of “Almagro” eggplants. *Int. J. Food Microbiol.*, 59: 9-17.
- Sawadogo-Lingani H., Diawara B., Traore A. S., 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(3): 873-882.
- Sawadogo-Lingani H., Lei V., Diawara B., Nielsen D. S., Møller P. L., Traore A. S., Jakobsen M., (2007).** The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort for the production of sorghum beer. *J. Appl. Microbiol.*, 103(4): 765-777.
- Schiffrin E. J., Blum S., (2002).** Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 56: 60-64.
- Schleifer K.H. et Kilpper-Bälz R., (1987).** Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *Streptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 10: 1-19.
- Schleifer K. H., (1986).** Gram positive cocci. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. ed. *Sneath, P.H.A., Mair, N.S. and Holt, J.G.* pp. 1043-1074.
- Scriban R., (1988).** Les industries agroalimentaires: progress des sciences et techniques. Lavoisier Tec. et Doc., 382p.
- Servin A. L., (2004).** Antagonistic activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28: 405-440.
- Sharples G. J. et Lloyd R. G., (1990).** A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucl. Acid Research.* 19 : 6503-6508.
- Simonart P. et Laudelout H., (1975).** Etude microbiologique et biochimique du vin de palme. *Bulletin de l'Institut Royal Colonial Belge*, 22 : 384-401.
- Simpson W. J., Taguchi H., (1995).** The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Wood B. J. B., Holzappel W. H. Chapman & Hall, London. 125-172.

- Sipiczki M., Romano P., Lipani G., Miklos I., Antunovics Z., (2001).** Analysis of yeast derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79 (1): 97-105.
- Sneath P. H. A., (2001).** The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria- Bacterial Nomenclature. Bergey's manual of systematic bacteriology. Garrity G.M., Boone D.R., Castenholz R.W. 2e Ed. 721: 83-88.
- Song H. J et Richard J., (1997).** Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. - *Int. J Food Microbiol.*, 36(2): 155-161.
- Soomro, A.T., Masud T. and Anwaar K., (2002).** Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in food preservation and human health. *Park. J. Nutr.*, 1: 20-24.
- Soyer Y., Koca N., Karadeniz F., (2003).** Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. *J. Food Comp. Anal.*, 16: 629-636.
- Steinkraus K. H., (2002).** Fermentations in World Food Processing. Comprehensive Reviews in *Food Science and Food Safety-Vol. 1:* 23-32.
- Steinkraus K. H., (1997).** Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control* 8: 311 -317.
- Steinkraus K. H., (1996).** Handbook of Indigenous Fermented Foods. 2nd Edition Revised and Enlarged. *New York, NY: Marcel Dekker.* 776 p.
- Steinkraus K. H., (1983a).** Handbook of Indigenous Fermented Foods. New York, NY: Marcel Dekker. 671 pages
- Steinkraus K. H., (1979).** Nutritionally significant indigenous fermented foods involving and alcoholic fermentation. In: Gastineau CF, Darby WJ, Turner TB, editors. Fermented Food Beverages in Nutrition. *New York, NY: Academic Press.* P 36-50.
- Stiles E. S., Holzapfel W. H., (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- Suziki K., Iijima K., Yamashita H. J., (2005).** Study on ATP production of Lactic Acid Bacteria in beer and development of a rapid pre-screening method for beer-spoilage bacteria. *J. Inst. Brew.*, 111(3): 328-335.
- Svec P., Vancanneyt M., Seman M., Snauwaert C., Lefebvre K., Sedlacek I. et Swings J., (2005).** Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 247: 59-63.
- Tamime A. Y. et O'Connor T. P., (1995).** Kishk: a dried fermented milk/cereal mixture. *Int. Dairy. J.*, 5: 109-128.

- Taranto M., Medici M., Perdigon G., Ruizholgado A., Valdez G., (1998).** Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypocholesterolemic mice. *J. Dairy Sci.*, 81: 2336-2340.
- Tchiendji C. (1985).** Le vin de palme d'*Elaeis guineensis*. Thèse Ecole Supérieure Agronomique et des industries alimentaires, Université de Nancy (France).
- Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H. et Swaminathan B., (1995).** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.
- Tesfaye W., Morales M. L., Garcia-Parrila M. C. et Troncoso A. M., (2002).** Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Sci. and Technol.* 13, 12-21.
- Thaoge M. L., Adams M. R., Sibara M. M., Watson T. G., Taylor J. R. N., Goyvaerts E. M., (2003).** Production of improved infant porridges from pearl millet using a lactic acid fermentation step and addition of sorghum malt to reduce viscosity of porridges with high protein, energy and solids (30%) content. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 305-310.
- Thompson L. V., Jenkins D. J. A., Amer M. A., Reichert R., Jenkins A., Kamulsky J., (1982).** The effect of fermented and unfermented milk on serum cholesterol, *Am. J. Clin. Nutr.* 36 1106-1111.
- 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. *J. Food Technol. Afr.*, 7: 93-97.
- Torriani S., Felis G., Dellaglio F., (2001).** Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. and Env. Microbiol.* 67, 3450–3454.
- Ukhum M. E., Okolie N. P., Oyerinde A. O., (2005).** Some mineral profiles of fresh and bottled palm wine a comparative study. *Afr J Biotechnol*, 4: 829-832.
- Uzogara S. G., Ezeokoli N. F et Uzogara (1990).** Tyramine content of some Nigerian foods. *Eco. food and Nutr.*, 19, 257-264.
- Uzochukwu S., Balogh E., Tucknot O. G., Lewis M. J., Ngoddy P. O., (1999).** Role of palm wine yeast and bacteria on palm wine aroma. *J. Food Sci. and Technol.* (India) 36(4): 301-304.
- Uzochukwu, S. V. A., Balogh, E., Tucknot, O. G., Lewis, M. J., et Ngoddy, P. O. (1997).** Volatiles of palm wine using solvent extracts. *J. Food Quality*, 20: 483-494.

- Uzochukwu S. V. A., Balogh E., Tucknot O. G., Lewis M. J., et Ngoddy P. O., (1994).** Volatile constituents of palm wine and palm sap. *J. the Sci. Food and Agric.*, 64: 405-411.
- Valyasevi R. et Rolle R. S., (2002).** An overview of small-scale fermentation technologies in developing countries with special reference to Thailand: Scope for their improvement. *Int. J. Food Microbiol.*, 75: 231-239.
- Vancanneyt M., Lombardi A., Andrighetto C., Knijff E., Torriani S., Bjorkrotn K. J., Franz C. M. A. P., Foulquié Moreno M.R., Revets H., De Vuyst L., Swings J., Kersters K., Dellaglio F. et Holzapfel W. H., (2002).** Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1381-1391.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J., (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematics. *Microbiol. Rev.*, 60(2), 407-438.
- Van Pee W. et swings J. G., (1971).** Chemical and microbiological studies on Congolese palm wines (*Elaeis guineensis*). *East Afr. Agr. Forest. J.* , 36: 311-314.
- Van Rensen C. A., Chikindas M. L., Van Zyl W. H. et Dicks L. M. T., (2003).** Characterization and heterologous expression of a class IIa Bacteriocin, plantacin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 29-40.
- Vaughan-Martini A., (2003).** Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology and medicine. *Int. J. Food Microbiol.*, 6: 175-182.
- Versalovic J., et Lupski J. R., (1998).** Interspersed repetitive sequence in bacterial genomes. In *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*, pp. 437-454. Edited by F. J. de Bruijn, J. R. Lupski and G. M. Weinstock. *New York: Chapman & Hall*.
- Versalovic J. T., Koeuth T., Zang Y. H., McCabe E. R. B. et Lupski J. R., (1992).** Quality control for bacterial inhibition assays: DNA fingerprinting of microorganisms by rep-PCR. *Screening* 1 : 175-183. Vinh,
- Versalovic J., Koeuth T. et Lupski J. R., (1991).** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19 : 6823-6831.
- Vezihet F., Blondin B. et Hallet J. N., (1990).** Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 32: 568-571.
- Vieira-Dalodé G., Jespersen L., Hounhouigan D.J., Moller P.L., Nago C.M., Jakobsen M. (2007).** Lactic acid bacteria and yeasts associated with gowé production from sorghum in Bénin. *J. Appl. Microbiol.*, 103: 342-349.

- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijjans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. et Zabeau M., (1995).** AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Williams J.G., Kubelikt A.R., Liva K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V. (1990).** DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor S., (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, P.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), PCR Protocols. Academic Press Inc, San Diego, USA, pp. 315–322.
- Wang K., Li S., Liu C., Perng D., Su Y., Wu D., Jan C., Lai C., Wang W., (2004).** Effects of ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*-containing yaourt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80: 737-741.
- Walter J., Hertel C., Tannock G. W., Lis C. M., Munro K. and Hammes W. P., (2001).** Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Env. Microbiol.* 67: 2578-2585.
- Wood B. J. B. and Holzapfel W. H., (1995).** *The Lactic Acid Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria*, 1st edition. Chapman and Hall, London. 78-81.
- Yamamoto N., Amemiya H., Tokomori X., Shimizu K. et Totsuka A., (1991).** Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *Am. J. Enol. and Viticul.*, 42: 359-363.
- Yao A. C., (2007).** Contribution à la mise en place de stratégies de lutte contre les adventices en culture de palmier à huile. Mémoire de fin d'étude. Ecole Supérieure d'Agronomie de Yamoussoukro / Côte d'Ivoire. 54p.
- Yao A. A., Egounlety M., Kouamé L. P., Thonart P., (2009).** Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylicés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest: leur utilisation actuelle. *Ann. Méd. Vét.*, 27-51
- Yoshizawa K., Ishikawa T., (1989).** Industrialization of Sake Manufacture. In: Steinkraus KH, editor. Industrialization of Indigenous Fermented Foods. *New York, NY: Marcel Dekker.* P 127-168.
- Yost C. K. et Nattress F. M., (2002).** Molecular typing techniques to characterize the development of a lactic acid bacteria community on vacuum-packaged beef. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 97–105.
- Yousif N. M. K., Dawyndt H., Abriouel A., Wijjaya U., Schillinger M., Vancanneyt J., Swings H. A., Dinar W. H., Holzapfel and Franz, M. A. P., (2005).** Molecular

characterization, technological properties and safety aspects of Enterococci from Hussuwa. An African fermented sorghum product. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 216-228.

Yvon M. et Rijnen L., (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* 11: 185-201.

PUBLICATION



The biochemical and microbiological quality of palm wine samples produced at different periods during tapping and changes which occurred during their storage

D. Karamoko, N.T. Djeni*, K.F. N'guessan, K.M.J.-P. Bouatenin, K.M. Dje

Department of Food Sciences and Technology, University of Abobo-Adjamé, Abidjan, Cote d'Ivoire

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 July 2011

Received in revised form

8 February 2012

Accepted 14 February 2012

Keywords:

Chemical analysis

Ethanol

Microbial composition

Organic acids

Palm wine

ABSTRACT

This study aimed at establishing biochemical and microbiological properties of different week-old fresh palm saps and assess whether changes occurring during storage of the fermenting saps could affect their quality. Based on the proximate and microbial analysis results, some differences in chemical compositions between fresh palm wine samples were observed. In general, the first day samples were very sugary (50% w/v) with the lowest loads of yeasts ($3.2 \pm 1 \cdot 10^3$ cfu/ml), while lactic, citric, tartaric acids and yeast population were characteristics related to both saps collected the second and third weeks of tapping. However, the fourth week wine samples were characterized by high ethanol ($3.18 \pm 0.06\%$) and acetic acid (0.767 ± 0.06 g/l) rates. During the storage, accumulation of alcohol occurred in all palm wine samples with the concurrent lactic and acetic acid fermentation taking place as well. Yeasts and lactic acid bacteria population also changed with undoubtedly influence on the palm wine quality.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Palm wine is made from the fermented sap of tropical plants of the *palmae* family, such as the oil palm (*Elaeis guineensis*), coconut palm (*Phoenix dactylifera*), date palm, nipa palm, kithul palm and raffia palm (*Raphia hookeri*) (Ayogu, 1999; Ejiofor, Okafor, & Ugwueze, 1994; Nwachukwu, Ibekwe, Nwabueze and Anyanwu., 2006; Sanni & Lonner, 1993). It is an alcoholic beverage that is produced and consumed in very large quantities in West Africa, and it is known throughout the major parts of Africa under various names, such as 'mimbo' in Cameroon, 'nsafufuo' in Ghana, 'emu' in Nigeria (Jespersen, 2003) and 'bandji' in Côte d'Ivoire. It is a popular drink consumed by more than 10 millions of people in West Africa (FAO, 1998, p. 134). It has been associated to life farmer because being less expensive and produced in the farming surroundings (Uzogara, Ezeokoli and Uzogara, 1987). This beverage represents in Africa a very important economic interest. Indeed, the consumed volumes are in the same way order of size than those of modern beers (Tchiendji, 1985). Because of the nutritional wealth of this non fermented sap, it is often proposed to the infant whose mother cannot produce the necessary milk for the nursing (Ayernor & Mathews, 1971; Ezeagu & Fafunso, 2003).

In various African countries and beyond, the sap of the palm tree is tapped and allowed to undergo spontaneous fermentation, which promotes the proliferation of yeast species for the conversion of the sweet substrate into an alcoholic beverage containing important nutritional components, including amino acids, proteins, vitamins and sugars (Okafor, 1972). The process of tapping palm wine involves first felling or cutting down the tree, leaving the felled tree for a period of about 2 weeks for the sap to concentrate, followed by tapping for up to 8 weeks. An incision is made in the floor of the well through which a bamboo tube is inserted to deliver the sap into a receiver, which may be a clay pot or a plastic container (Hartley, 1984, pp. 600–603; Okraku-Offei, 1968). Many problems associated with the different aspects of indigenous food fermentation processes including lack of good manufacturing procedure or hygiene code; lake of knowledge of the culture process; absence of any control in that the processing variables like pH, temperature, humidity and quality of water were unknown, lack of knowledge of nutritional and toxicological implication of the fermentation are important with particular reference to palm wine tapping and processing in that the quality is determined among others by the effectiveness of the tapping or fermentation process.

To be acceptable to most consumers, palm wine must not only be whitish in appearance and have a pleasant sugary taste, but must also exhibit vigorous effervescence. Since the micro-organisms in the wine are alive they metabolize away the pleasant sugary taste of the fresh wine and produce various organic acids (Bassir, 1962; Faparusi & Bassir, 1972; Van Pee & Swings, 1971).

* Corresponding author. 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire. Tel.: +225 07095546.

E-mail address: dtheodore33@yahoo.fr (N.T. Djeni).

Thus, if the collected palm wine is not consumed within a few days, it begins to develop a vinegary taste, which is unacceptable to consumers.

Many studies have been done in Nigeria and other African countries during the past 20 years on various aspects of palm wine (Okafor, 1978; Van Pee & Swings, 1971), but so far, very few published studies on the biochemical and microbial changes of the wine have been reported and even none on the nutritional value quantification during storage. As palm wine has a significant role in customary practices in Africa, it is important that the microbiology and biochemistry of its fermentation process are well understood. Thus, this study was carried out to determine the biochemical and microbiological composition of palm wine samples collected at weekly intervals during tapping and also changes which occurred during storage of these samples.

2. Materials and methods

2.1. Materials and sampling

Palm wine samples were obtained during the tapping of 25 palm trees (*E. guineensis*) at the University of Abobo-Adjamé (Côte d'Ivoire) over a period of 5 months. Collection of palm wine during tapping was normally done twice a day by the tapper, but in this study samples were collected at weekly intervals each morning of sampling day at 7:00 AM in stomacher bags from the beginning until the end of tapping. These samples were immediately transported to the laboratory for analysis, which was carried out in replicates. For elucidating the microbiological and chemical changes which occur during the storage of the palm wine, samples collected from different trees on a particular day were pooled together in sterile flasks, kept at ambient temperature (28–30 °C) for 32 h and sampled every 8 h. The storage experiments were carried out in three replicates.

2.2. Biochemical analysis

2.2.1. Determination of pH and total titratable acidity

The pH of palm wine samples was determined directly using a pH-meter (pH-meter P 107, CONSORT, Bioblock, France) after calibration with standard buffers. Total titratable acidity was determined by titrating samples against 0.1 M NaOH using 1% phenolphthalein as indicator as described by Amoah-Awua, Sampson, and Tano-Debrah (2007) and expressed as percentage of lactic acid.

2.2.2. Determination of total and reducing sugars

Total sugars in palm wine samples were determined using phenol sulphuric acid method according to Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, and Smith (1956), while reducing sugars were quantified as previously described by Bernfeld (1955). Two independent measurements were made on each sample and results were expressed in g/l.

2.2.3. Organic acids and ethanol determination

2.2.3.1. *Samples preparation.* Samples were centrifuged at 4000 rpm for 20 min and supernatants were filtered through a 0.20 µm Millipore membrane filter (Sartorius AG, Goettingen, Germany) and then stored at –20 °C until analysis.

2.2.3.2. *Organic acids content.* Organic acid were determined by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) as previously described by N'guessan (2009), pp. 55–57. Analyses were carried out with an ion-exclusion ORH-801 column (300 × 6.5 mm) (Interchrom, France) preceded by a Universal Guard Cartridge-

Holder column. The High-Performance Liquid Chromatograph system (LC-6A, Shimadzu Corporation, Japan) was equipped of a Shimadzu LC-6A pump. Column effluents were monitored by a UV detector (SPD-6A, Shimadzu Corporation, Japan) set at 210 nm. The mobile phase (0.004 N H₂SO₄) used at a low rate of 0.8 ml/min was filtered through a 0.45 µm Millipore membrane filter (Sartorius AG, Goettingen, Germany). A 20 µl injection volume was used for HPLC samples and the analyses were done in duplicate.

The organic acids standards were dissolved in distilled water at concentrations ranging to 0.05–0.4 g/l, filtered and injected as the samples. Organic acids were identified and quantified by comparison of their retention times and peak areas with those of standards.

2.2.3.3. *Ethanol content.* Ethanol content was determined by gas chromatographic analyses, carried out using a Shimadzu CG-14A gas chromatograph. Filtered samples (2 µl) were directly injected into the system. The temperature was set at 8 °C/min. Injector and detector temperature were 200 °C and 250 °C, respectively. Helium at 2 kg/cm² was used as a carrier gas and the external standard method was used for the quantitative determination of ethanol.

2.3. Intensity of fermentation during storage

The intensity of palm wine fermentation during storage was separately determined on 100 ml of samples by measuring the volume of gas released per hour using an experimental device described by Pol, 1996, pp. 72–73.

2.4. Enumeration of micro-organisms

The palm wine samples were shaken by hand in the stomacher bag and tenfold serial dilutions were prepared and spread-plated for determination of micro-organism counts. After dilutions, enumeration of total aerobic mesophile was carried out using plates of Plate Count Agar (PCA, Difco 0479-17-3; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) which were incubated at 30 °C for 2 days. Lactic acid bacteria (gram positive catalase negative rods, cocci and coccoids) were enumerated by pour plate on DeMan, Rogosa and Sharpe Agar (MRS, Merck 10660; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) containing 10 mg/ml cycloheximide (ICN 100183 Biomedical Inc., Aurora, OH, USA) to suppress yeast growth after incubation at 30 °C for 3 days in an anaerobic jar with anaerocult A (Merck). Yeasts and moulds were enumerated on plates of Sabouraud Chloramphenicol agar (BIO-RAD, France) which were incubated at 30 °C for 3–5 days. Enumeration of total and faecal coliforms was carried out using plates of Violet Red Bile Lactose agar (VRBL, Merck 10660, Merck, Darmstadt, Germany) which were incubated for 24 h at 30 °C for total coliforms and 44 °C for faecal coliforms. *Enterococci* species were enumerated on plates of Bile Esculin Azide agar (AES Laboratoire, COMBOURG France) after incubation at 37 °C for 2 days.

2.5. Statistical analysis

The data obtained were subjected to analysis of variance (Statistica, 99 Edition) and mean differences determined by Duncan's multiple range test at a significance level ($P < 0.05$). Principal component analysis (PCA) was used to establish relationship among variables represented by palm wine compounds. Only factors with eigenvalues > 1 were retained and Varimax rotation was used as rotation type. PCA was performed using XLSTAT software program.

3. Results and discussion

3.1. Chemical and microbial characteristics of fresh palm wines

The chemical and microbial composition of fresh palm wines collected weekly during tapping is showed in Tables 1 and 2. The products obtained during the first day of tapping were very sugary, less sour and did not contain substantial concentrations of alcohol. The initial total soluble sugars content of fresh palm wine was 501.68 ± 26 g/l (about 50% w/v) and do not correlate with the observed values of Odunfa (1985) and Olasupo and Obayori (2003) that fresh palm wine exhibits a sugar content of 10–12%. The pH, reducing sugars, dry matters and ethanol contents were respectively 5.2 ± 0.03 , 45.6 ± 6.4 g/l, $17.2 \pm 0.4\%$ and $0.08 \pm 0.02\%$ respectively. Throughout the tapping, a subsequent drop of pH and sugars content associated with an increase of the acidity and alcohol rate were observed. Indeed, at the fourth week of tapping, palm wine samples had pH values of 3.4, with a total titratable acidity of $0.61 \pm 0.02\%$ and $3.2 \pm 0.1\%$ of alcohol. Total organic acids content reached values of 3.6 g/l in the 2nd week sap (Table 1). The decrease in sugar content is a clear indication that a large portion of the sugars is fermented especially during the early stages of tapping (first week). Moreover, the observed increase in acidity is indicative of the fact that production of acids in the fermentation sap occurred concurrently with alcohol production (Olasupo & Obayori, 2003).

The organic acids detected in the freshly collected palm wine (first day) included oxalic (0.1 g/l), citric (0.05 g/l), tartaric (0.31 g/l), malic (0.5 g/l), ascorbic (0.05 g/l), fumaric (0.01 g/l), lactic (0.15 g/l) and acetic (0.1 g/l) acids (Table 1). The high concentration of tartaric and malic acids in the early times of tapping and the increase throughout the tapping could suggest that these acids are native to the exudates and are also produced abundantly during the process as reported by Akalin, Gönç, and Akbast (2002), Soyer, Koca, and Karadeniz (2003) and Karadeniz (2004). However, lactic and acetic acids are not native to the exudates but are produced throughout the tapping process, though some may be present in the plant as anions neutralized by cations such as potassium (Uzochukwu, Balogh, Tucknot, Lewis, & Ngoddy, 1997). Their content increased to reach 0.79 ± 0.1 g/l of lactic acid in the sap collected the 2nd week and 0.77 ± 0.06 g/l of acetic acid in this of the 4th week. Whiting (1973) has shown that when fructose is available in wines and LAB are able to grow, they can produce equimolar amounts of

lactic and acetic acids from fructose and this could constitute a serious source of acetic acid in the wine. The fructose produced early in palm wine fermentation as a by-product of dextran synthesis by LAB are likely to have been used in this way by the same bacteria to produce lactic and acetic acids. Moreover, the finding of a considerable amount of acetic acid in palm wine is not an indication of spoilage by acetic acid bacteria as is the case in conventional wines and as previously assumes (Faparusi, 1973; Okafor, 1978) for palm wine. Also, as acetic acid was present in all the mature palm wine samples, it was considered as part of the aroma of palm wine (Amoa-Awua et al., 2007).

The spontaneous fermentation palm oil sap, although a simple way to achieve palm wine involves a complex microbial process, and may result in variations in quality of the beverage as observed by Kingamkono, Sjögren, Svanberg, and Kaijser (1995) for "togwa", a traditional fermented gruel or beverage. The sap of the palm tree has been shown to be a rich medium capable of supporting the growth of various types of micro-organisms, as high numbers of aerobic mesophiles, lactic acid bacteria, yeasts, Enterococci and coliforms were found in palm wine during at each stage of tapping (Table 2). It was shown that these micro-organisms in fresh palm wine might have originated from those that colonize those parts of the palm stalk of the male inflorescence, the leaf petiole, the felt (a fabric-like outgrowth of the frond petiole used to cover the tapping hole) the cross strips and xylem stream which are covered with fluffy hairy outgrowths (Faparusi, 1973). Some of them were also brought by the tapper, tapping materials and insects attracted by the sap sugar.

The results of pH, TTA and organic acids confirmed the importance of lactic acid bacteria in the fermentation of palm wine. In fact, lactic acid bacteria were considered to be responsible for the rapid acidification of the product as the acetic acid bacteria were not isolated in the palm wine samples on the first days of tapping (Amoa-Awua et al., 2007). Our results showed high loads of LAB already in the first day sap ($2.1 \pm 1.1 \times 10^8$ cfu/ml) and these stayed slightly constant in the other samples until the fourth week sap ($1.8 \pm 2.0 \times 10^8$ cfu/ml). With respect to the other microbial populations, a drastic increase was observed in yeast numbers from average values of $3.2 \pm 1.9 \times 10^3$ cfu/ml in the first day sap to $1.6 \pm 0.3 \times 10^8$ cfu/ml in the fresh samples collected the third week of tapping (Table 2). The high increase of yeast population could be related the increased of alcohol content throughout the tapping process, as it is well known that yeasts may produced alcohol

Table 1
Main analytical characteristics of the fresh palm wine samples collected weekly during the tapping.

Parameters	Palm wine samples				
	1st ds	1st ws	2nd ws	3rd ws	4th ws
pH	5.2 ± 0.03^a	4.2 ± 0.02^b	4.1 ± 0.01^{bc}	4.1 ± 0.01^c	3.4 ± 0.01^c
TTA (%)	0.25 ± 0.02^a	0.42 ± 0.1^b	0.49 ± 0.03^{bc}	0.52 ± 0.01^b	0.61 ± 0.02^c
RS (g/l)	45.6 ± 6.4^b	14.6 ± 3.7^b	62 ± 8.4^c	41.3 ± 7.8^a	22.4 ± 3.7^d
TSC (g/l)	502 ± 26^a	210 ± 10.1^b	79 ± 6.1^c	64 ± 7.0^d	54 ± 3.2^d
Ethanol	0.08 ± 0.02^a	0.82 ± 0.04^b	1.10 ± 0.23^c	1.70 ± 0.06^d	3.20 ± 0.1^e
TOA (g/l)	1.8 ± 0.04^a	2.1 ± 0.04^b	3.0 ± 0.6^c	4.0 ± 0.8^d	2.30 ± 0.04^b
Oxalic acid	0.1 ± 0.01^a	0.001 ± 0.005^b	0.40 ± 0.02^c	0.40 ± 0.03^c	0.10 ± 0.01^a
Citric acid	0.05 ± 0.03^a	0.20 ± 0.03^b	0.06 ± 0.02^a	0.10 ± 0.03^c	0.40 ± 0.02^d
Tartaric acid	0.31 ± 0.1^a	0.40 ± 0.03^b	0.10 ± 0.02^c	0.30 ± 0.01^d	0.20 ± 0.02^e
Malic acid	0.50 ± 0.12^a	0.8 ± 0.2^b	0.60 ± 0.14^c	1.0 ± 0.2^d	0.70 ± 0.13^{bc}
Ascorbic acid	0.05 ± 0.03^a	0.04 ± 0.01^a	0.24 ± 0.04^b	0.13 ± 0.07^c	0.13 ± 0.08^c
Lactic acid	0.15 ± 0.07^a	0.30 ± 0.01^b	0.79 ± 0.1^c	0.64 ± 0.23^d	0.40 ± 0.08^e
Acetic acid	0.10 ± 0.05^a	0.30 ± 0.04^b	0.70 ± 0.1^c	0.77 ± 0.2^d	0.77 ± 0.1^d
Fumaric acid	0.01 ± 0.01^a	0.01 ± 0.005^a	0.01 ± 0.002^a	0.03 ± 0.002^{ab}	0.003 ± 0.002^b

Values are means of three determinations. In a line, means values followed by different superscript are statistically different (Duncan multiple test range at $P \leq 0.05$). 1st ds: first day sap; 1st ws: first week sap; 2nd ws: second week sap; 3rd ws: third week sap; 4th ws: fourth week sap. TTA: Total Titratable Acidity; RS: Reducing Sugar; TSC: Total soluble carbohydrates; TOA: Total Organic Acids.

Table 2

Mean values of the population of various micro-organisms in samples of fresh palm wine collected weekly during the tapping.

Micro-organisms cfu/ml	Palm wine samples				
	1st ds	1st ws	2nd ws	3rd ws	4th ws
AM	2.6 ± 1.0 10 ^{9a}	4.1 ± 2.0 10 ^{9b}	2.5 ± 2.5 10 ^{10c}	1.9 ± 1.6 10 ^{10c}	4.1 ± 1.3 10 ^{8d}
Yeasts & moulds	3.2 ± 1.9 10 ^{3a}	2.3 ± 1.3 10 ^{7b}	1.2 ± 0.3 10 ^{8c}	1.6 ± 0.3 10 ^{8c}	1.0 ± 1.6 10 ^{8c}
LAB	2.1 ± 1.1 10 ^{8ac}	1.2 ± 1.6 10 ^{8b}	2.4 ± 1.9 10 ^{8a}	2.7 ± 2.5 10 ^{8a}	1.8 ± 2.0 10 ^{8c}
<i>Enterococcus</i> sp.	1.5 ± 1.1 10 ^{7a}	8.9 ± 1.3 10 ^{5b}	1.8 ± 1.3 10 ^{6b}	1.4 ± 0.6 10 ^{8c}	4.6 ± 2.5 10 ^{8d}
Total coliforms	2.8 ± 1.1 10 ^{7a}	5.8 ± 5.0 10 ^{9b}	9.3 ± 2.0 10 ^{7c}	6.5 ± 2.0 10 ^{7c}	1.5 ± 0.3 10 ^{7a}
Faecal coliforms	2.8 ± 0.8 10 ^{5a}	3.1 ± 3.2 10 ^{8b}	2.1 ± 1.6 10 ^{7c}	1.9 ± 1.3 10 ^{7cd}	1.2 ± 0.5 10 ^{7d}

Values are means of three determinations. In a line, means values followed by different superscript are statistically different (Duncan multiple test range at $P \leq 0.05$). AM: aerobic mesophiles; 1st ds: first day sap; 1st ws: first week sap; 2nd ws: second week sap; 3rd ws: third week sap; 4th ws: fourth week sap.

(Mugula, Narvhus, & Sørhaug, 2003). However, LAB species have also been reported to produce ethanol (Hansen & Hansen, 1996). A substantial part of *Enterococci* sp and coliforms were present in the different saps with the highest loads in those collected the 1st and 4th weeks respectively for coliforms ($5.8 \pm 5.0 \times 10^9$ cfu/ml) and *Enterococci* species ($4.6 \pm 2.5 \times 10^8$ cfu/ml) (Table 2).

In an attempt to simplify interpretation of the data and determine for each palm wine collected, Principal Component Analysis of the matrix of correlation coefficients was computed from data in Tables 1 and 2. The first two principal component explained 82.20% of the variation in the data, with the first component (PC1) accounting for more than 57.33% of the variation and the second component (PC2) accounting for 24.87% of the variation. Fig. 1 shows the representation of microbial and chemical characteristics and samples according to the first and the second dimensions. As could be expected, most of the acidity characteristics were highly correlated and represented closely in the map (lactic, citric, tartaric, acetic acids and total titratable acidity). The exception was malic and oxalic acids, represented far from the others. Other

natural high (negative) correlations were acidity and pH and also sugars and acidity represented in opposite sides of the figure. When palm wine samples were plotted on the space created by the two dimensions, the sap collected the first day of tapping was found to be on the positive side of dimension 1, in opposite of the saps of the third and fourth weeks. Both saps were also in opposite of those of the first and second weeks according to dimension 2. These samples were diversely represented on the figure. The first day samples were represented in the figure close to dry matter, pH, total soluble carbohydrates, total reducing sugars and fumaric acid, whereas the samples collected the first and second weeks were characterized by their high malic and oxalic acids contents, and their high aerobic mesophiles and coliforms populations. *Enterococcus* species, acetic acid and ethanol were characteristic of saps collected the fourth week, while LAB population was higher in the third week samples. Lactic, citric, tartaric acids and yeast population were characteristics related to both saps collected the second and third week of tapping.

3.2. Changes in the characteristics of palm wine during storage

The process of tapping of palm wine from felled trees can be considered as semi-continuous fermentation. Periodically (every day, twice a day), samples were collected and added to the previous samples in a container placed near the tree. In the traditional setting, palm wine tapping instruments, especially receiving vessels are used repeatedly without cleaning the inner surfaces to remove the microbial deposits (Loumbe, Kabawila, Maloaga, Bayeada, & Manda, 1985; Okafor, 1978). So, rapid deterioration of sugary taste is observed shortly after the fresh exudate is obtained. This is the result of fermentation of endogenous sugars by the natural flora of the fermenting sap which is whitish in appearance and also exhibit vigorous effervescence. Such effervescence, expressed as gas released after conversion of sugars or other compounds into alcohol and other by-products was more intensive in the saps collected the early stage of tapping (up to 2 weeks) (Fig. 2a). In the same way, the metabolism of sugars was more important in these saps (data not showed), but the ethanol content was the highest throughout storage in the oldest sap (3.18–4.2%) (Fig. 2b). According to Amoa-Awua et al. (2007), holding/storing palm wine produced little changes in the population of the various micro-organisms present, yet showed a steady increase in the average alcohol content from 3.42% to 8.16%. This was very revealing as it showed that the development of alcohol in palm wine was more pronounced during the handling of the product than during the tapping. Indeed, since the micro-organisms in the wine are alive, they metabolize away the pleasant sugary taste of the fresh wine and produce alcohols and various organic acids (Bassir, 1962; Van Pee & Swings, 1971). Based on the above observations, the fermentation of palm wine can be described on three a three stage fermentation as already stated by Amoa-Awua et al.

Biplot after varimax rotation
(axes F1 et F2 : 82,20 %)

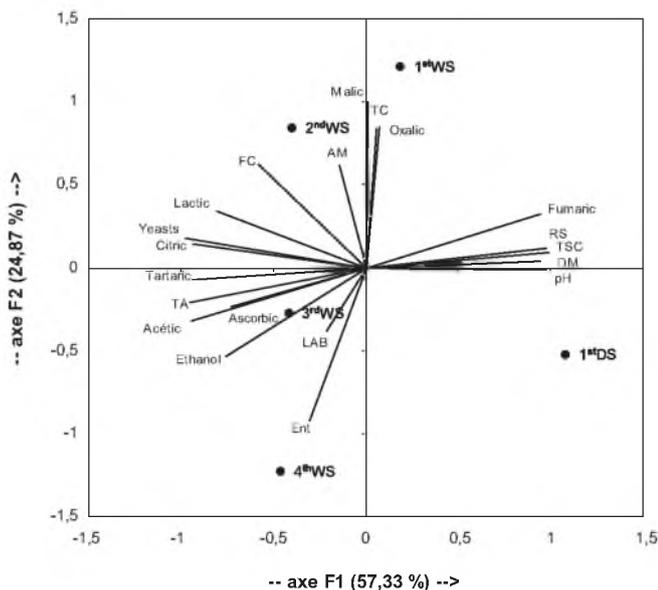


Fig. 1. PCA (Principal component analysis) of the biochemical and microbial characteristics of fresh palm saps. 1st ds: first day sap; 1st ws: first week sap; 2nd ws: second week sap; 3rd ws: third week sap; 4th ws: fourth week sap; AM: aerobic mesophiles; DM: dry matter; Ent: *Enterococcus* sp.; FC: faecal coliforms; LAB: lactic acid bacteria; RS: reducing sugars; TC: total coliforms; TSC: total soluble carbohydrates; TTA: total titratable acidity.

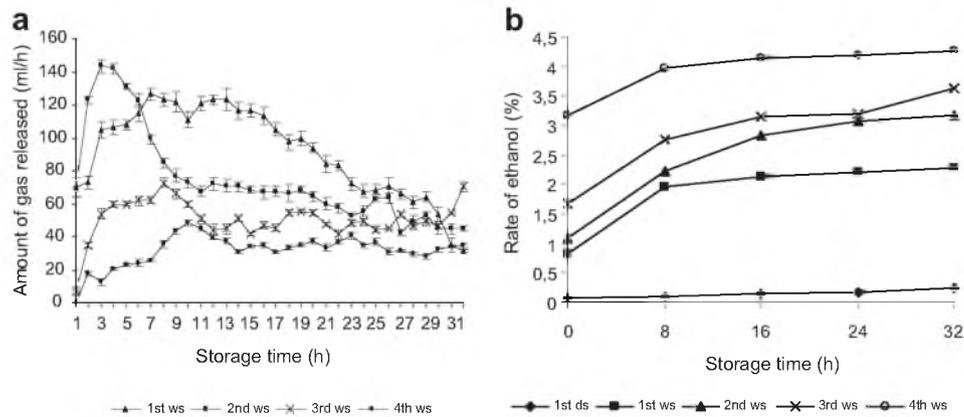


Fig. 2. Production of gas (a) and ethanol (b) during the storage for 32 h of different palm wine samples. 1st ds: first day sap; 1st ws: first week sap; 2nd ws: second week sap; 3rd ws: third week sap; 4th ws: fourth week sap.

(2007). According to these authors, the first level occurs in the receptacle cut out in the palm tree itself. This occurs as a continuous culture fermentation although the palm wine tapper periodically disturbs the microbial population in the biological fermentor (a semi-continuous). The second level occurs as palm wine accumulates in the container placed under the tree. The buildup of alcohol in the container is faster than in the tree trunk because there is no loss of the product from this chamber although there is continual dilution of the contents with the fermenting juice trickling in. The highest buildup in alcohol level occurs during the distribution and

marketing. This third stage of fermentation occurs as a batch process under more anaerobic conditions, which favours alcoholic fermentation by the yeasts. Among all collected palm wines, this collected the first day showed the lowest ethanol content during storage (Fig. 2b), and this could be due to its very high sugar content and its low population of yeasts just after it was collected.

Storage of palm wine eventually led to the accumulation of organic acids to very high concentrations in all the stored samples. Indeed, because it contains living organisms, its sweetish pleasant taste is soon lost and replaced by acidity caused by bacterial action.

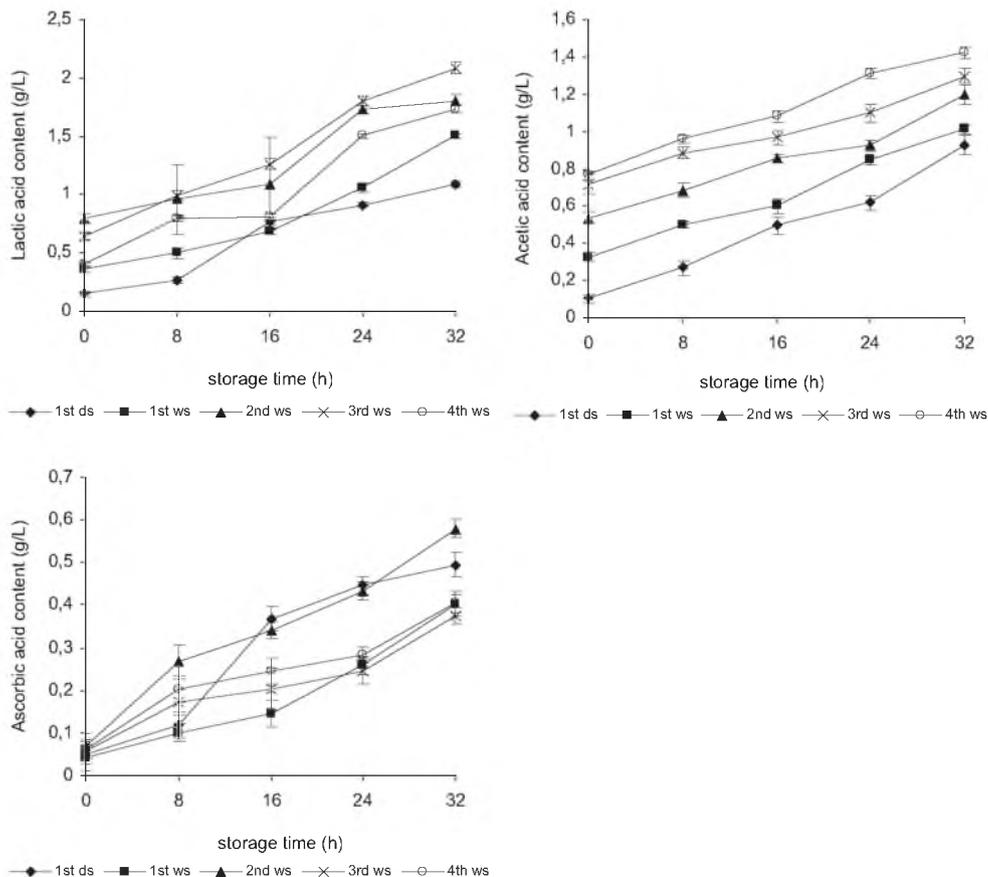


Fig. 3. Changes in the content of the main organic acids produced during the storage for 32 h of different palm wine samples. 1st ds: first day sap; 1st ws: first week sap; 2nd ws: second week sap; 3rd ws: third week sap; 4th ws: fourth week sap.

Lactic, acetic and ascorbic acids increased within 32 h (Fig. 3). The accumulation of these acids was very important in 2nd and 3rd week tapping saps for lactic and ascorbic acids (respectively 2.08 ± 0.1 g/l and 0.58 ± 0.02 g/l) and in the 3rd and 4th week for acetic acid (0.7 ± 0.2 g/l). In the actively fermenting palm wine, acetic acid was found to be the most abundant volatile acid, making up 42.07% as stated by Uzochukwu et al., 1997. Tartaric acid decreased but the other acids increased within 8–16 h or 24 h before decreasing until 32 h of storage for all the samples (Fig. 4). The important increase in organic acid contents could undoubtedly have inhibitory effects on microbial growth, particularly those which do not support high acid conditions. Indeed, an initial increase followed by a decrease in total coliforms loads and the disappearance of faecal coliforms after only 24 h of storage were

observed (Fig. 5a and b). This is in accordance with the death kinetics reported in similar natural fermented plant materials (Masha, Ipsen, Petersen, & Jakobsen, 1998; Nout, Rombouts, & Havelaar, 1989). According to Mortimore and Wallace (1997), pp. 53–59, only 1 g/l of undissociated citric acid can inhibit a significant concentration of enterobacteria. Moreover ascorbic acid, like many other edible organic acids, has been reported to inhibit the growth of many foodborne pathogenic and spoilage bacteria (Guenier, Caillet, Ouattara, Laleye, & Lacroix, 2010).

Storing palm wine for 32 h also produced changes in the population of the other micro-organisms present. The lactic acid bacteria population in replicate samples increased and remained fairly similar in the 1st day, 1st week and 2nd week saps, and then began to drop after 24 h of storage (Fig. 5d). The yeasts population

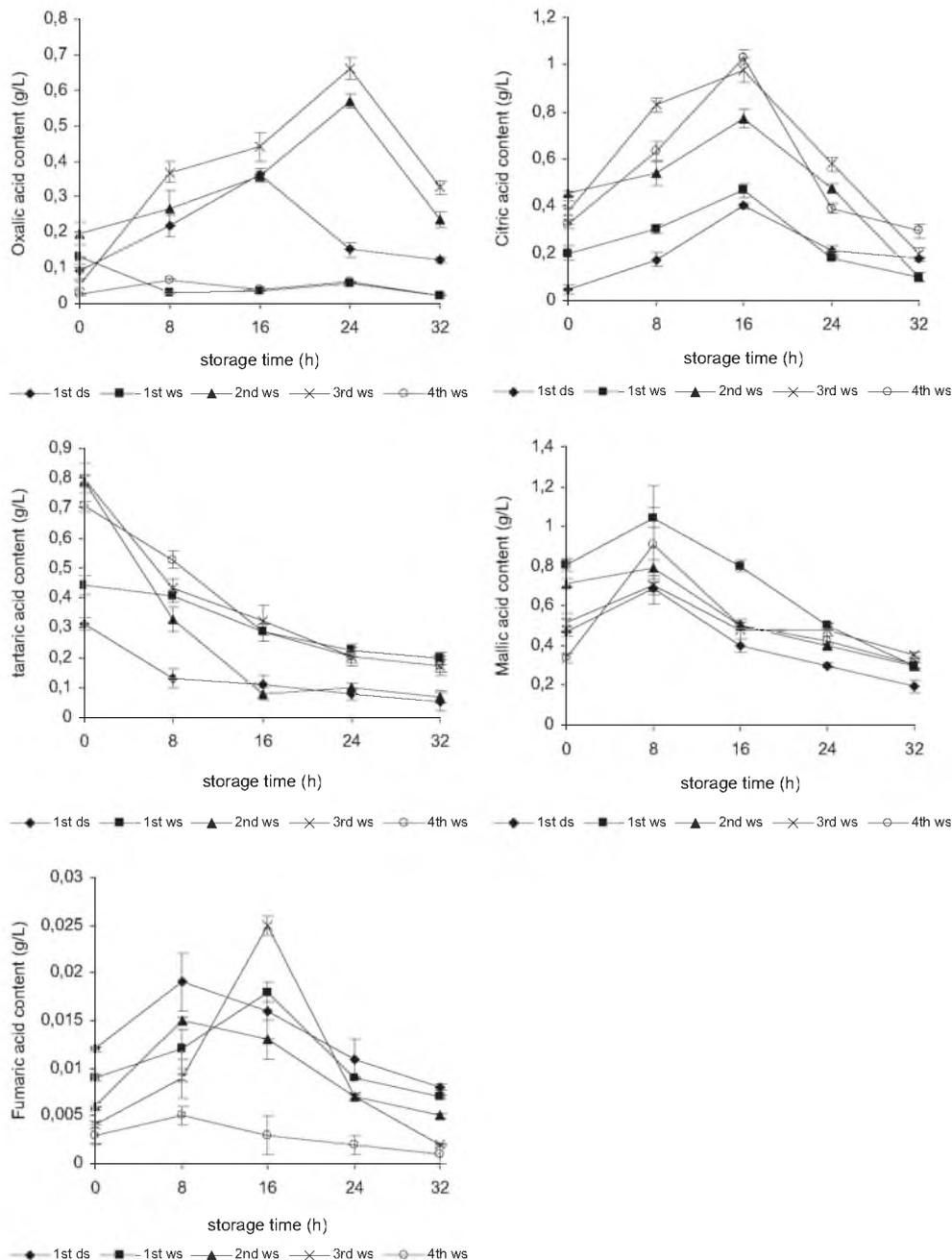


Fig. 4. Changes in the content of the other organic acids during the storage for 32 h of different palm wine samples. 1st ds: first day sap; 1st ws: first week sap; 2nd ws: second week sap; 3rd ws: third week sap; 4th ws: fourth week sap.

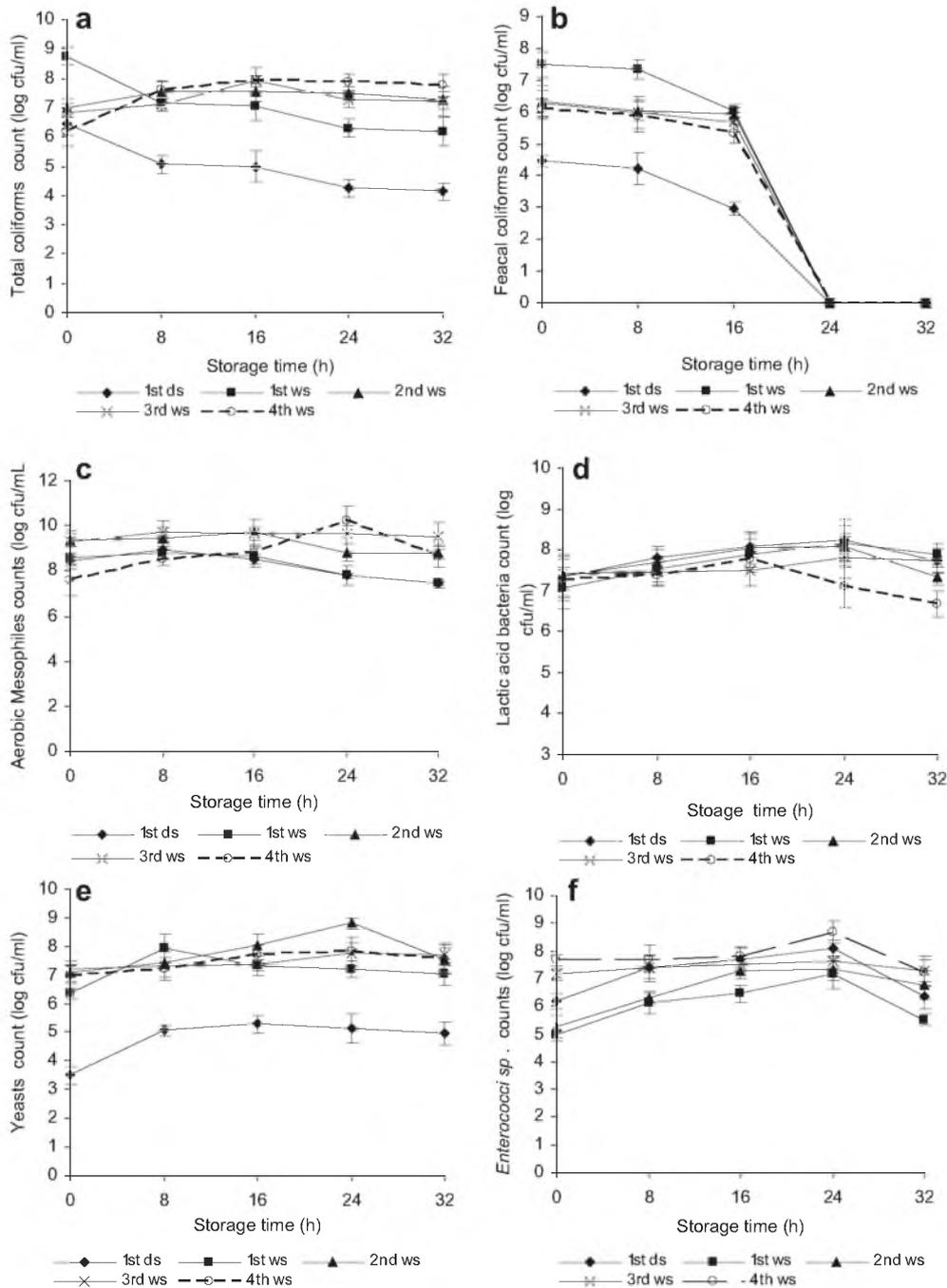


Fig. 5. Mean values of the population of various micro-organisms in different samples of palm wine during the storage for 32 h (a) total and (b) faecal coliforms (c) Aerobic mesophiles, (d) lactic acid bacteria, (e) yeasts, (f) *Enterococcus* sp. 1st ds: first day sap; 1st ws: first week sap; 2nd ws: second week sap; 3rd ws: third week sap; 4th ws: fourth week sap.

also increased and reached highest values in the 1st week ($8.3 \pm 3.2 \times 10^7$ cfu/ml after 8 h) and 2nd week ($6.6 \pm 1.6 \times 10^9$ cfu/ml after 24 h) saps (Fig. 5e), while enterococci population remained most abundant in the 4th week sap until the end of storage (Fig. 5f).

To conclude in this study, important microbial changes occurred in the various palm wine samples during storage, with the highest changes in the oldest samples. Those undoubtedly have an effect on the biochemical and the safety of this beverage, and so far its nutritional value. The presence of an important population of lactic acid bacteria could have a benefic effect on consumer health and thus increasing the interest of this beverage. Therefore, further

studies on their technological properties could help to elucidate the involvement of these micro-organisms in the food safety and the improvement of the consumer digestion; as palm wine is consumed with its wild micro-organisms generally without any toxicity has been observed.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge M. Joel BONOUMAN for his assistance in HPLC and CG analysis.

References

- Akalin, A. S., Gönc, S., & Akbast, Y. (2002). Variation in organic acids content during ripening of pickled white cheese. *Journal of Dairy Science*, 85, 1670–1676.
- Amoa-Awua, W. K., Sampson, E., & Tano-Debrah, K. (2007). Growth of yeasts, lactic and acetic bacteria in palm wine during tapping and fermentation from felled oil palm (*Elaeis guineensis*) in Ghana. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 599–606.
- Ayernor, G. K. S., & Mathews, J. S. (1971). The sap of the palm *Elaeis guineensis* Jacq as raw material for alcoholic fermentation in Ghana. *Tropical Science*, 13, 71–83.
- Ayogu, T. E. (1999). Evaluation of the performance of a yeast isolate from Nigerian palm wine in wine production from pineapple fruits. *Bioresource Technology*, 69, 189–190.
- Bassir, O. (1962). Observation on the fermentation of palm wine. *West African Journal of Biology and Chemistry*, 6, 2–20.
- Bernfeld, D. (1955). Analyse β and α . In Colowick, S. P., & Kaplan, N. O. (Eds.). (1955). *Methods in enzymology*, Vol. 1 (pp. 149–154). New York: Academic Press, Inc.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colometric method for determinations of sugars and related substances. *Analytic Chemistry*, 28, 350–356.
- Ejiofor, A. O., Okafor, N., & Ugwueze, E. N. (1994). Development of baking yeast from Nigerian palm wine yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 199–202.
- Ezeagu, I. E., & Fafunso, M. A. (2003). Biochemical constituents of palm wine. *Ecology and Food Nutrition*, 42, 213–222.
- FAO. (1998). *Fermented fruits and vegetables. A global perspective*. Agricultural Services Bulletin. Food and Agricultural Organization.
- Faparusi, S. I. (1973). Origin of initial microflora of palm wine from oil palm trees (*Elaeis guineensis*). *Journal of Applied Bacteriology*, 36, 559–565.
- Faparusi, S. I., & Bassir, O. (1972). Factors affecting the quality of palm wine. I. Period of tapping a palm tree. *West African Journal of Biology and Applied Chemistry*, 15, 17–22.
- Guenier, A.-S., Caillet, S., Ouattara, B., Laleye, L., & Lacroix, M. (2010). Antibacterial capacity of a reconstituted fortified beverage used as a nutritional supplement. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2010.08.007.
- Jespersen, L. (2003). Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Res.*, 3, 191–200.
- Hansen, A., & Hansen, B. (1996). Flavour of sourdough wheat crumb. *Z Lebensm Unters Forsch*, 202, 244–249.
- Hartley, C. W. S. (1984). *The oil palm, Elaeis guineensis jacq* (2nd ed.). London: Longman Group Ltd.
- Karadeniz, F. (2004). Main organic acid distribution of authentic citrus juices in Turkey. *Turkey Journal of Agriculture and Forest*, 28, 267–271.
- Kingamkono, R., Sjögren, E., Svanberg, U., & Kaijser, B. (1995). Inhibition of different strains of enteropathogens in a lactic fermenting cereal gruel. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 299–303.
- Loumbe, D. S., Kabawila, C., Maloaga, M., Bayeada, J. P., & Manda, V. G. (1985). *Etude préliminaire de la microbiologie et de biochimie du vin de palme Elaeis guineensis*. A paper presented at a Conference organized by the International Foundation for Science and the United Nations University Japan in Douala, Cameroon.
- Masha, G. K., Ipsen, M. A., Petersen, M. A., & Jakobsen, M. (1998). Microbiological, rheological and aromatic characteristics of fermented 'uji' (an East African sour porridge). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 451–456.
- Mortimore, S., & Wallace, C. (1997). *HACCP: A practical approach*. New York: Chapman & Hall.
- Mugula, J. K., Narvhus, J. A., & Sørhaug, 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.
- N'guessan K. F. (2009). *Analyse de quelques paramètres de la fermentation alcoolique conduisant au tchapalo (bière traditionnelle à base de sorgho) et des potentialités à la formulation d'une culture starter à partir de levures isolées*. Thèse de Doctorat Unique, Université Abobo-Adjamé.
- Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., & Havelaar, A. (1989). Effect of natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 8, 351–361.
- Nwachukwu, I. N., Ibekwe, V. I., Nwabueze, R. N., & Anyanwu, B. N. (2006). Characterisation of palm wine yeast isolates for industrial utilization. *African Journal of Biotechnology*, 5, 1725–1728.
- Odufa, S. A. (1985). African fermented foods. In Wood, B. J. B. (Ed.). (1985). *Microbiology of fermented food*, Vol. 2 (pp. 155–191). UK: Elsevier Applied Science Publishers.
- Okafor, N. (1978). Microbiology and biochemistry of oil palm wine. *Advanced in Applied Microbiology*, 24, 237–256.
- Okafor, N. (1972). Palm wine yeasts from parts of Nigeria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23, 1399–1407.
- Okraku-Offei, G. (1968). Palm wine, microbiology and chemical changes during fermentation. Bsc. Dissertation, University of Ghana.
- Olasupo, N. A., & Obayori, O. S. (2003). Utilization of palm wine (*Elaeis guineensis*) for the improved production of Nigerian indigenous alcoholic drink Oogoro. *Journal of Food Processing and Preservation*, 27, 365–372.
- Pol, D. (1996). *Travaux pratiques des biologies des levures*. Paris, France: Ellipses Edition Marketing, ISBN 2-7298-5668-4.
- Sanni, A. I., & Lonner, C. (1993). Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiology*, 10, 517–523.
- Soyer, Y., Koca, N., & Karadeniz, F. (2003). Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 629–636.
- Tchiendji, C. (1985). *Le vin de palme d'Elaeis guineensis*. Thèse Ecole Supérieure Agronomique et des industries alimentaires, Université de Nancy (France).
- Uzochukwu, S. V. A., Balogh, E., Tucknot, O. G., Lewis, M. J., & Ngoddy, P. O. (1997). Volatiles of palm wine using solvent extracts. *Journal of Food Quality*, 20, 483–494.
- Uzogara, S. G., Ezeokoli, N. F., & Uzogara. (1987). Tyramine content of some Nigerian foods. *Ecology of Food and Nutrition*, 19, 257–264.
- Van Pee, W., & Swings, J. G. (1971). Chemical and microbiological studies on Congolese palm wines (*Elaeis guineensis*). *East Africa Agriculture and Forest Journal*, 36, 311–314.
- Whiting, G. C. (1973). Acetification in ciders and perries. *Journal Instrumental Brewing*, 79, 218–226.

RESUME

Le vin de la palme est la sève fermentée de plantes monocotylédones rencontrées dans la zone intertropicale. Malgré le rôle considérable que joue cette boisson dans l'activité économique des pays producteurs et consommateurs, elle présente un problème majeur, à savoir qu'elle ne se conserve pas plus de trois jours sans altération de ses qualités organoleptiques. Cette étude vise à isoler quelques microorganismes et identifier les bactéries lactiques au cours de l'extraction et du stockage du vin de palme à la température ambiante (28-30°C). Des prélèvements de vin de palme ont été réalisés tous les trois jours pendant l'exploitation des palmiers à huile des variétés *Tenera* et *Dura*. Différentes analyses microbiologiques et physico-chimiques ont été réalisées sur les vins pendant quatre (4) semaines d'exploitations. Le vin de palme de la variété *Dura* est riche en sucres totaux (501,68 ± 26 g/L), sucres réducteurs (45,6 ± 6,4 g/L), une viscosité élevée (8,28 cP), un faible taux d'éthanol (0,08 ± 0,02 %), et un pH moins acide (5,23 ± 0,03) que celui du vin de la variété *Tenera*. Pendant l'exploitation du vin de palme, tous les paramètres cités diminuent progressivement jusqu'à la fin de l'exploitation. La vitamine C et le taux d'éthanol restent élevés dans le vin de la variété *Tenera*. La charge des microorganismes est plus élevée dans les vins extraits de la variété *Tenera*. En début d'exploitation, les charges sont de log 10,2 ± 0,1 UFC/mL pour les GAM. Les charges des bactéries lactiques, les levures, les Entérocoques, les coliformes totaux et les germes anaérobies sulfite-réducteurs sont respectivement de log 8,6 ± 0,2 UFC/mL, log 5,6 ± 0,3 UFC/mL, log 7,5 ± 0,2 UFC/mL, log 7,5 ± 0,2 UFC/mL et log 1,6 ± 0,2 UFC/mL. Ces charges restent élevées jusqu'à la fin de l'exploitation des palmiers. Des prélèvements de vin de palme ont été réalisés le premier jour et toutes les semaines au cours de l'exploitation des palmiers à huile de la variété *Dura*. Dans les différents vins de palme appelés V0, V1, V2, V3 et V4, les analyses microbiologiques et physico-chimiques ont été réalisées sur les vins toutes les 8 heures jusqu'à 32 heures de conservation. La charge en GAM varie de log 7,6 ± 0,1 à 9,4 ± 0,3 UFC/mL. La charge des bactéries lactiques et levures est plus élevée dans le vin de palme V3 avec des charges respectives de log 7,4 ± 0,1 UFC/mL et de log 7,2 ± 0,3 UFC/mL. La charge des Entérocoques en début de stockage, est plus élevée (log 7,7 ± 0,2 UFC/mL) dans le vin de palme V4. Les résultats obtenus révèlent une diminution lente et progressive du pH, des sucres totaux et des sucres réducteurs du vin de palme pendant le stockage. L'acidité titrable augmente pendant le stockage de même que la quantité de vitamine C. Le vin de palme V0 contient le taux de sucres totaux le plus élevé (501,68 ± 22,6 mg/mL). Le regroupement des différentes souches a donné 5 genres de bactéries lactiques. Parmi les 5 (cinq) genres de bactéries lactiques, *Lactobacillus* est dominant avec une proportion de 52,86% suivi de *Pediococcus* qui représente 31,43%. Pendant l'exploitation du vin de palme, l'espèce *Pediococcus pentosaceus* est dominante avec une proportion de 9,29% alors que pendant le stockage du vin de palme, *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* est la souche dominante avec une proportion de 14,29%. Par ailleurs, l'étude physiologique des isolats de *Pediococcus pentosaceus* pris au hasard a permis de révéler que toutes les souches sont homofermentaires et les isolats de *Lactobacillus pentosus* sont composés de 83,33% de souches homofermentaires et 16,67% de souches hétérofermentaires.

Mots clés : Palmiers à huile, paramètres physicochimiques et microbiologiques, éthanol, stockage, bactéries lactiques

SUMMARY

Palm wine is made from the fermented sap of tropical plants. As palm wine has a significant role in the economic activity of producing and consuming countries, several problems associated with the different aspects of indigenous food have been identified. This is among other things the lack of good manufacturing procedure or safety code; lack of knowledge of the culture process; absence of any control in that the processing variables (pH, temperature and quality of water), lack of knowledge of nutritional and toxicological implication of fermentation. This study was carried out to determine the biochemical, microbiological characteristics and follow the dynamics of lactic acid bacteria during production and storage of palm wine of two palms varieties. Palm wine samples were collected every three days during using of oil palm trees (*Tenera* and *Dura*). Various microbiological and biochemical analyzes were performed on wines for four (4) weeks of tapping. Palm wine of *Dura* variety is rich in total sugar (501.68 ± 26 g / L), reducing sugars (45.6 ± 6.4 g / L), high viscosity (8.28 cP), a low level of ethanol (0.08 ± 0.02%), and a less acidic pH (5.23 ± 0.03) than the wine *Tenera* variety. During the using of palm wine, all parameters mentioned decrease gradually until the end of tapping. Vitamin C and the ethanol rates remain high in the wine *Tenera* variety. The load of microorganisms is higher in the extracts of wine *Tenera* variety. Early tapping of palm wine expenses are 10.2 ± 0.1 log CFU / mL for AM. Loads of LAB, Yeasts, Enterococci species, Total coliforms and sulphite-reducing anaerobes were respectively 8.6 ± 0.2 log CFU / mL, 5.6 ± 0.3 log CFU / mL, log 7.5 ± 0.2 CFU / mL, 7.5 ± 0.2 log CFU / mL and 1.6 ± 0.2 log CFU / mL. These charges remain high until the end of the exploitation of palm trees. Samples of palm wine was also made on the first day and every week during tapping the oil palm variety of *Dura*. In different palm wine called V0, V1, V2, V3 and V4, microbiological and physico-chemical analyzes were performed on wines every 8 hours up to 32 hours of storage. The load of AM log 7.6 ± 0.1 to 9.4 ± 0.3 CFU / mL. The load of yeasts and LAB is greater in the palm wine V3 with respective loads of 7.4 ± 0.1 log CFU / mL and 7.2 ± 0.3 log CFU / mL. The burden of Enterococci species early storage, is higher (7.7 ± 0.2 log CFU / mL) in the palm wine V4. The results show a slow and gradual decrease in pH, total sugars and reducing sugars palm wine during storage. The titratable acidity increase during storage as well as the amount of vitamin C. Palm wine V0 contains the highest total sugar (501.68 ± 22.6 mg / mL). The grouping of different strains gave 5 kinds of LAB. Among five (5) kinds of LAB, *Lactobacillus* is dominant with a proportion of 52.86%, followed by representing 31.43% *Pediococcus*. During the operation of palm wine, *Pediococcus pentosaceus* is dominant with a share of 9.29% while during storage of palm wine, *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* sp is the dominant strain with a proportion of 14.29%. Furthermore, the physiological study of isolates of *Pediococcus pentosaceus* random revealed that all strains and isolates are homofermentative *Lactobacillus pentosus* are composed of 83.33% and 16.67% homofermentative strains of heterofermentative strains.

Keywords : Palm oil trees, biochemical and microbiological parameters, ethanol, storage, lactic acid bacteria