

Variabilité des propriétés physico-chimiques et dénombrement de la flore fermentaire du tchapalo, une bière traditionnelle de sorgho en Côte d'Ivoire

Solange AKA^{1,2*}, N'Dédé Théodore DJENI¹, Kouadio Florent N'GUESSAN¹,
Kouadio Célestin YAO² et Koffi Marcellin DJE¹

¹ Laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire, Université d'Abobo-Adjamé, UFR des Sciences et technologies des aliments, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

² Laboratoire national de la santé publique, 18 BP 2403 Abidjan 18, Côte d'Ivoire

* Correspondance, courriel : solangeakan@yahoo.fr

Résumé

Une étude portant sur la variabilité des propriétés physico-chimiques et microbiologiques, l'évolution de ces propriétés au cours de la fermentation alcoolique a été réalisée sur des échantillons de moût sucré (produit intermédiaire) et de tchapalo (bière de sorgho) prélevés dans une zone de production massive à Abobo, commune située au Nord-Est d'Abidjan. Il ressort de cette étude que la qualité des moûts et tchapalo produits était constante. Le pH (3,4), les teneurs en sucres (3,6 g/100 g), en protéines (2,9 mg/mL) et en vitamine C (1,5 mg/100 mL) des moûts sucrés étaient statistiquement les mêmes chez toutes les brasseuses et ne variaient pas d'une production à l'autre. Le tchapalo obtenu après fermentation contenait en moyenne 5,2 % d'éthanol. Le méthanol et le propanol n'ont pas été détectés. Les levures avec 1.9×10^8 ufc/mL constituaient la microflore dominante du tchapalo. Les bactéries lactiques isolées appartenaient aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc*.

Mots-clés : *Tchapalo, bière traditionnelle, propriétés physico-chimiques, fermentation.*

Abstract

Variability of biochemical and microbiological properties of tchapalo, a traditional sorghum beer in Côte d'Ivoire

A study of the variability of biochemical and microbiological properties, and evolution of these properties during alcoholic fermentation was carried out on samples of sweet wort

(intermediate product) and tchapalo (sorghum beer) in area where the production is higher from Abobo, northeaster area from Abidjan. The results of these analysis showed that sweet wort and tchapalo had constant quality in the study's area because fluctuations of biochemical properties were not significant. pH (3,4), total sugars (3,6 g/100 g), proteins (2,9 mg/mL) and vitamin C (1,5 mg/100 mL) of sweet wort were practically the same between productions and one woman to another. Tchapalo obtained after the alcoholic fermentation contained 5,2 % of ethanol; but it not contained the methanol and propanol. Yeasts with 1.9×10^8 cfu/mL constituted the dominant microflora of tchapalo. Lactic acid bacteria isolated belonged to the genus *Lactobacillus* and *Leuconostoc*.

Keywords : *Tchapalo, traditional beer, biochemical properties, alcoholic fermentation.*

1. Introduction

L'Homme utilise depuis des millénaires la fermentation pour obtenir des aliments de valeur nutritive améliorée [1]. En Afrique, certaines céréales telles que le sorgho, le maïs et le mil sont souvent transformées en boisson dont la fabrication comprend une étape essentielle de fermentation alcoolique [2-4]. Ces boissons jouent un rôle parfois central dans les cultures des peuples. En effet, souvent attachées aux traditions d'hospitalité et de convivialité, elles font partie du savoir vivre de la plupart des familles et servent à sceller des relations entre les individus [5]. A l'instar des autres pays de la sous région, en Côte d'Ivoire, le sorgho est généralement transformé en une bière traditionnelle appelée « tchapalo ». Initialement produit dans le Nord du pays, cette boisson s'est implantée progressivement dans toute la capitale économique où elle connaît un essor remarquable [6,7].

Dans son processus technologique empirique intervient une double fermentation : une fermentation alcoolique à laquelle s'associe une fermentation lactique naturelle [8]. Au fil du temps, les conditions de fabrication n'ont pas évolué. Le séchage des grains de sorgho germé se fait toujours en plein air, en bordure des voies. De plus, le processus de production souffre d'un manque crucial d'instrument de mesure de précision, de bonnes pratiques d'hygiène et les moûts sucrés successifs sont inoculés avec le ferment issu de fermentations précédentes, sans qu'on connaisse bien la nature réelle de ce ferment [6,7]. Les bières ainsi obtenues sont instables et de qualité inconstante. Dans le but d'améliorer les qualités organoleptiques, nutritionnelles et microbiologiques de ce produit traditionnel, nous nous sommes proposés dans ce travail, d'étudier la variabilité des propriétés physico-chimiques de différentes productions de moût sucré et de tchapalo et de dénombrer la flore fermentaire du tchapalo.

2. Matériel et méthodes

2-1. Processus de fabrication du tchapalo

Le processus de fabrication du tchapalo est représenté à la **Figure 1** : les grains de sorgho sont trempés dans l'eau pendant 7 à 10 heures, germés pendant trois jours et séchés. Le malt ainsi obtenu est moulu pour donner la farine, puis empâté. Le dépôt est précuit pendant 2 à 2 h 30 min, le moût obtenu après mélange du surnageant et du dépôt précuit est laissé reposer pendant 9 à 12 h au cours desquelles il se produit une fermentation lactique naturelle. Après filtration, le filtrat aigre ou moût aigre subit une cuisson durant 5 à 6 h pour donner le moût sucré qui est par la suite refroidi et ensemencé avec un ferment traditionnel. Après une fermentation alcoolique qui dure 9 à 12 h le produit obtenu constitue le tchapalo.

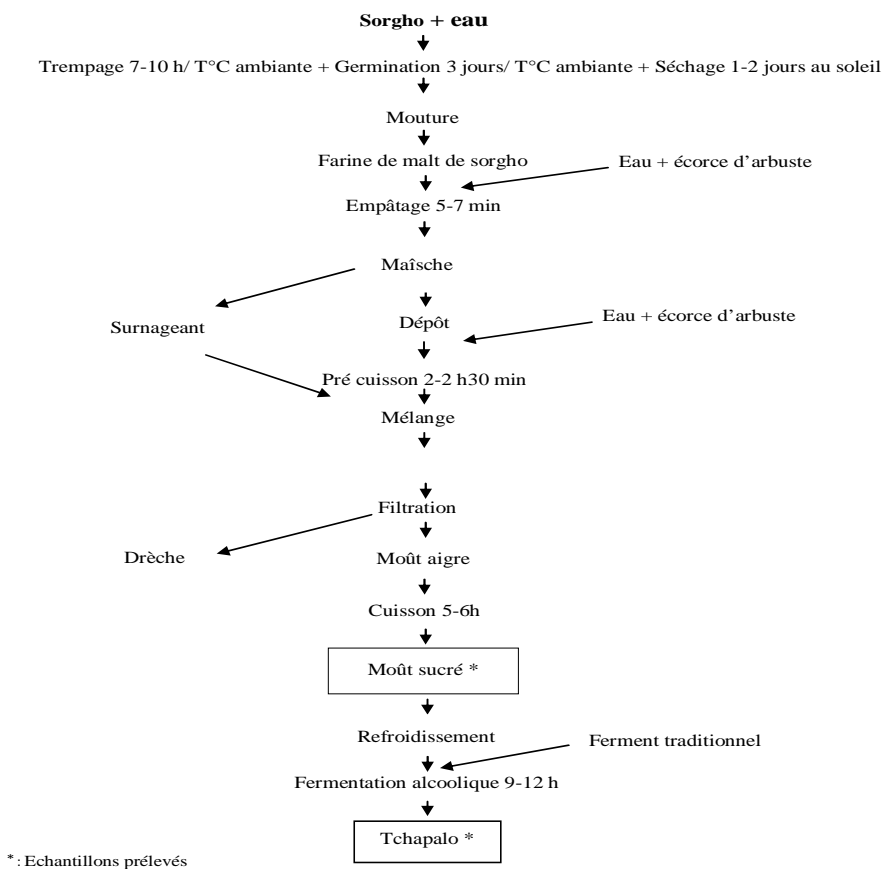


Figure 1 : Processus de production du tchapalo

2-2. Collecte des échantillons

L'échantillonnage a été réalisé sur dix productions successives chez trois brasseuses dans une zone de production massive à Abobo, commune située au Nord-Est d'Abidjan. Pour chaque production de tchapalo, le premier prélèvement a été effectué sur le moût sucré chaud et le deuxième, sur le tchapalo prêt à la consommation. Les échantillons ont été prélevés dans des flacons stériles de 500 mL, étiquetés et transportés au laboratoire dans un bac à glace. Au total, trente échantillons de moût sucré et de tchapalo ont fait l'objet d'étude.

2-3. Analyse des propriétés physico-chimiques

Le pH a été mesuré avec un pH-mètre (pH-meter P 107 bioblock, France) et l'Extrait Sec Réfractométrique (ESR) a été déterminé à l'aide d'un réfractomètre portable. L'acidité totale a été dosée selon la méthode de *Bremond* [9]. La densité a été déterminée par le rapport de la masse volumique de l'échantillon sur celle de l'eau. La concentration en vitamine C a été déterminée selon la méthode de *Tomohiro* [10]. Le taux de cendre a été déterminé par le rapport de la masse de l'échantillon après incinération à 650°C pendant 6 h sur la masse de l'échantillon avant incinération. Les protéines ont été dosées selon la méthode de *Bradford* [11]. Les teneurs en sucres totaux et en sucres réducteurs ont été déterminées respectivement selon les méthodes de *Dubois et al.*, [12] et *Bernfel* [13]. La détection des alcools (éthanol, méthanol et propanol) a été réalisée par la chromatographie en phase gazeuse (shimadzu G M-9AM) munie d'une colonne capillaire à partir du distillat du tchapalo. La teneur en éthanol a été déterminée avec la méthode de *Le Coq* [14].

2-4. Dénombrement des bactéries lactiques et des levures

La méthode classique de bactériologie a été utilisée dans cette étude [15-17]. Elle a consisté à additionner aseptiquement 1 mL de chaque échantillon à 9 mL d'une solution stérile de NaCl 0,9 % puis à homogénéiser. Les dilutions successives ont été réalisées (10^{-1} à 10^{-7}) et 0,1 mL d'aliquote d'une dilution bien appropriée a étéensemencé en double par étalement en surface sur les milieux de culture suivants :

- la gélose Man Rogosa Sharpe [18]; (AFNOR, NF ISO 15214), incubée à 30°C pendant 48 h en anaérobiose pour dénombrer les *Lactobacillus* et les *Pediococcus*.
- la gélose de Mayeux [19], incubée à 25°C pendant 24 à 48 h pour dénombrer les *Leuconostoc*.
- la gélose Bile Esculine Azide (BEA, ISO 7899/1) incubée à 37°C pendant 48 h pour dénombrer les *Enterococcus*.

- la gélose de Chalmers incubée à 25°C pendant 48 h pour dénombrer les *Lactococcus*.
- la gélose sabouraud + chloramphénicol incubée à 25°C pendant 3 à 5 jours pour dénombrer les *Levures*.

Les colonies caractéristiques ont été dénombrées sur la base de quelques critères morphologiques et biochimiques (couleur des colonies, mobilité, état frais, coloration de Gram, forme et taille des cellules, absence de sporulation, de cytochrome oxydase, absence de catalase pour les bactéries lactiques, production de catalase et bourgeonnement pour les levures).

2.5. Analyses statistiques

L'analyse des données a été réalisée avec la méthode de ANOVA à un et deux facteur (s) à l'aide du logiciel STATISTICA (Stat., Soft, Inc, 1995). Les différences statistiques avec une valeur de probabilité inférieure à 0,05 (P<0,05) sont considérées comme significatives. Quand la probabilité est supérieure à 0,05 (P>0,05) les différences statistiques ne sont pas significatives.

3. Résultats

3-1. Fluctuation des propriétés du moût sucré

Bien qu'une irrégularité apparente soit observée (*Figures 2 et 3*), les analyses de variances indiquent que ces fluctuations ne sont pas significatives (P>0,05). Les paramètres étudiés sont donc statistiquement semblables d'une production à une autre chez la même brasserie et d'une brasserie à une autre. Ceci permet de déterminer une valeur moyenne pour chaque paramètre étudié (*Tableau 1*).

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques du moût et du tchapalo

Paramètres	Densité	ESR (°Brix)	pH	AT (%)	Vitamine C (mg/100mL)	TC (%)	Protéines (mg/mL)	ST (g/100g)	SR (g/100g)	TA (% vol, alc.)
Echantillons	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD
Moût sucré	1,05±0	15,2±2,0	3,5±0,2	1,1±0,4	1,1±0,5	0,3±0,1	2,7±1,0	3,6±1,6	1,1±0,6	-
Tchapalo	1,01±0	7,9±0,9	3,3±0,2	1,3±0,5	1,5±0,6	0,3±0,1	2,9±1,3	0,5±0,4	0,1±0,1	5,2±1,1

X : Moyenne ; SD : Ecart type ; ESR : Extrait sec réfractométrique ; AT : Acidité totale ; TC : Taux de cendre ; ST : Sucres totaux ; SR : Sucres réducteurs ; TA : Taux d'alcool

Il faut cependant remarquer que pour certains échantillons, des valeurs suffisamment différentes de la moyenne ont été observées. Ainsi pour une valeur moyenne de 1,1 % d'acidité totale, une valeur extrême minimale de 0,6 % est obtenue et une valeur maximale de 2,3 % est aussi observée. L'ESR varie entre 9 et 21,4°Brix avec une moyenne de 15,2°Brix. La teneur en protéines oscille entre 0,8 et 5,7 mg/mL avec une moyenne de 2,7 mg/mL.

3-2. Fluctuation des propriétés du tchapalo

La différence entre les ESR des échantillons de tchapalo est significative ($P < 0,05$) avec une valeur minimale de 5,6°Brix, une valeur maximale de 10,6°Brix et une valeur moyenne de 7,9°Brix (*Figures 2 et 3*). A part cette différence, les autres paramètres étudiés sont statistiquement identiques ($P > 0,05$). Comme précédemment, une valeur moyenne pour chaque paramètre a été déterminée (*Tableau 1*). Toutefois il apparaît des fluctuations donnant des valeurs largement éloignées de la moyenne. C'est le cas des protéines, dont la teneur est en moyenne de 2,9 mg/mL avec une valeur minimal de 0,6 mg/mL et une valeur maximale de 7 mg/mL. La vitamine C oscille entre 0,2 mg/100 mL et 2,3 mg/100 mL avec une moyenne de 1,5 mg/100 mL.

3-3. Identification des alcools du tchapalo

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse pour la détection du méthanol, du propanol et de l'éthanol a révélé la présence de l'éthanol dans tous les échantillons analysés. Le méthanol et le propanol n'ont été détectés dans aucun échantillon. L'analyse statistique donne une variabilité non significative ($P > 0,05$) du taux d'éthanol dont la valeur moyenne est de 5,2 % vol. alc. (Volume alcool) (*Tableau 1*). Le distillat de tchapalo est incolore avec un goût aigre et un arôme caractéristique. Ces propriétés organoleptiques n'ont pas évolué au fil du temps.

3-4. Evolution des propriétés physico-chimiques au cours de la fermentation

La comparaison des propriétés physico-chimiques du moût sucré et celles du tchapalo a permis de regrouper les paramètres en deux catégories :

- catégorie A : paramètres dont les valeurs moyennes sont statistiquement identiques ($P > 0,05$) dans le moût sucré et dans le tchapalo autrement dit, les paramètres qui n'évoluent pas au cours de la fermentation du moût. Se retrouvent dans cette catégorie le pH, l'acidité totale, le taux de cendre et la teneur en protéines (*Figures 2*);
- catégorie B : paramètres dont les valeurs moyennes évoluent significativement ($P < 0,05$) au cours de la fermentation du moût en tchapalo. Dans cette catégorie se

retrouvent la teneur en sucres totaux dont le taux moyen passe de 3,6 g/100 g dans le moût sucré à 0,5 g/100 g dans le tchapalo ; soit une chute de 86,1 % après fermentation (**Figures 3**). La teneur en sucres réducteurs subit également une baisse de l'ordre de 90,9 % en moyenne. Les valeurs d'ESR et de la densité diminuent respectivement d'environ 48 % et 3,8 % et le taux de vitamine C augmente de 36,4 %.

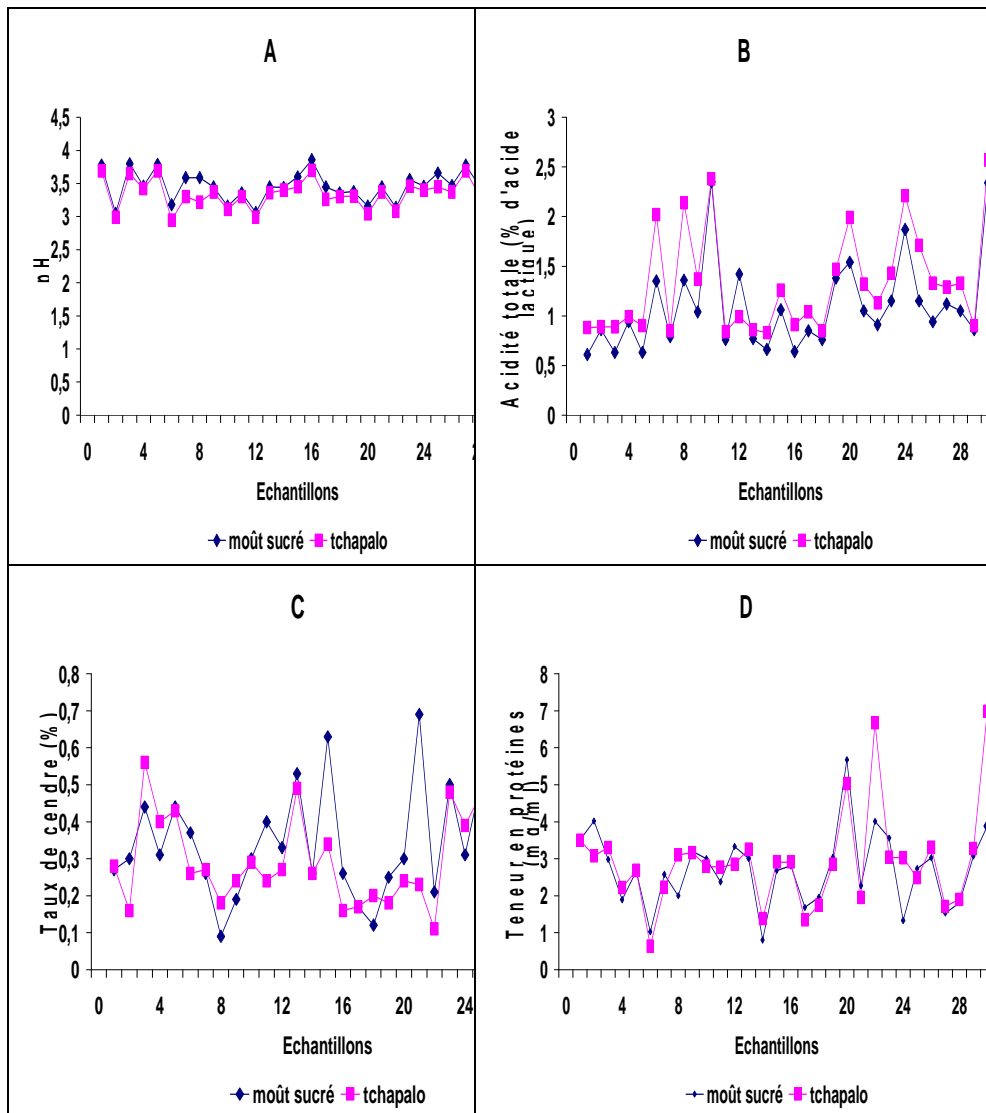


Figure 2 : Propriétés n'évoluant pas au cours de la fermentation du moût sucré (◆) en tchapalo (■): A : pH ; B : Acidité totale ; C : taux de cendre ; D : Teneur en protéines

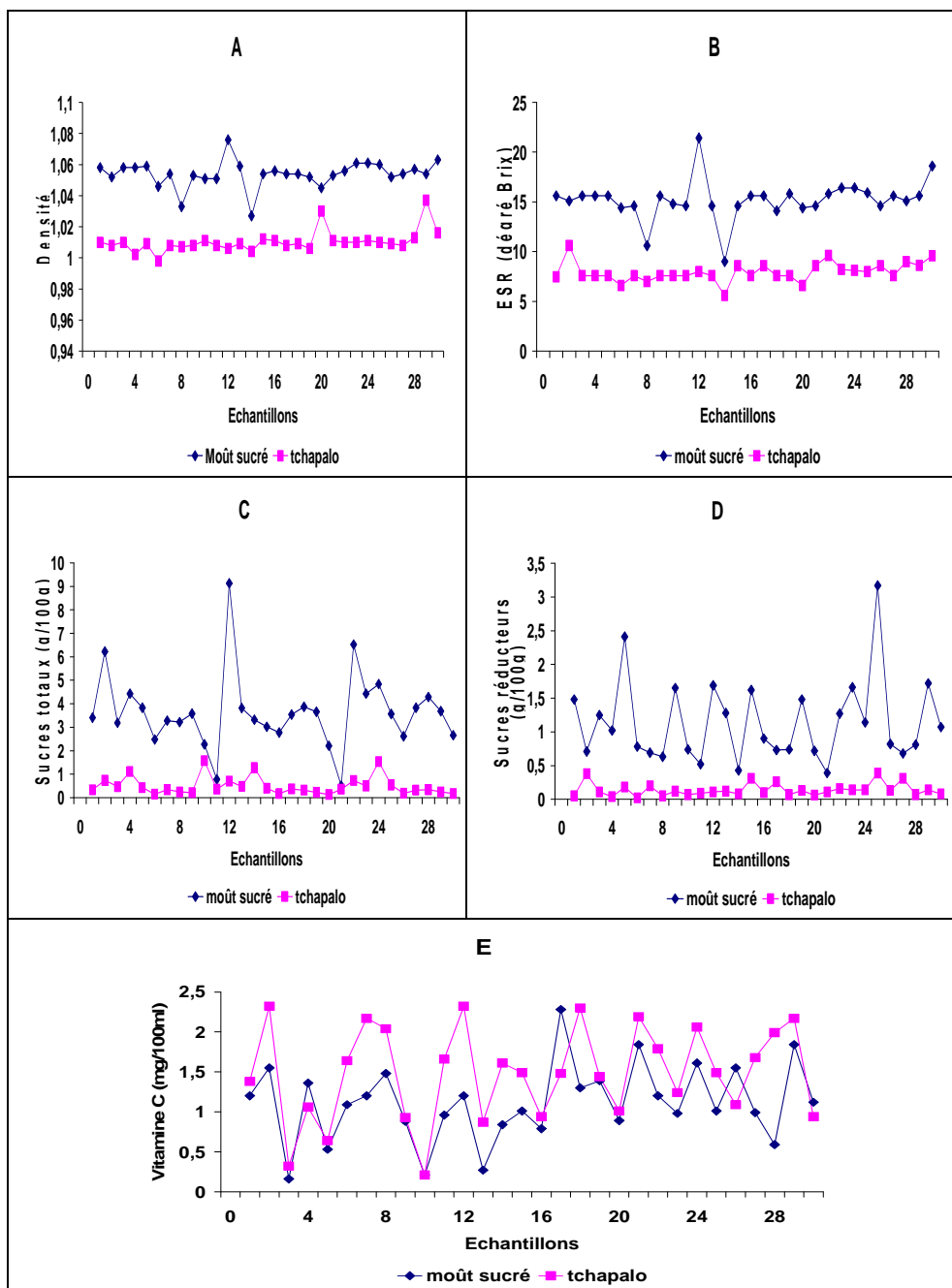


Figure 3 : Propriétés évoluant au cours de la fermentation du moût sucré (—◆) en tchapalo (—■): A : Densité ; B : ESR ; C : Sucres totaux ; D : sucres réducteurs ; E : Vitamine C

3-5. Dénombrement de la flore fermentaire

La charge levurienne ($1,9 \times 10^8$ ufc/mL) est plus élevée que celle des *Lactobacillus* ($1,5 \times 10^3$ ufc/mL) et *Leuconostoc* ($7,4 \times 10^2$ ufc/mL) donc, les levures constituent la flore dominante dans le tchapalo. Par contre, *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Pediococcus* n'ont pas été isolés (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Charge de la microflore fermentaire présente dans le tchapalo (ufc/mL)

Genres	Levures	Lactobacillus	Leuconostoc	Enterococcus	Lactococcus	Pediococcus
Tchapalo	$1,9.10^8 \pm 3,8.10^8$	$1,5.10^3 \pm 2,0.10^3$	$7,4.10^2 \pm 4,5.10^3$	0	0	0

4. Discussion

Les analyses statistiques effectuées sur la composition physico-chimique du moût sucré et celle du tchapalo ont révélé qu'il n'y a pas de différence significative entre les mêmes types d'échantillons d'une production à une autre et d'une brasserie à une autre. A première vue, cette régularité paraît surprenante puisque la production, de type artisanale est faite sans appareil de mesure de précision ; les opérations se faisant par simple appréciation visuelle et sensorielle. Cette invariabilité apparente pourrait s'expliquer par le fait que la fabrication étant empirique, les brasseuses ont gardé les réflexes et les habitudes. Par conséquent, les mesures approximatives donnent des produits finis plus ou moins identiques. Les productions de cette zone peuvent être considérées comme de qualité constante. Cependant, les fluctuations observées, peuvent avoir une incidence notoire sur le plan nutritionnel, alimentaire et économique.

Ces résultats sont similaires à ceux de *Yao et al.* [6] qui indiquent que les analyses faites sur le tchapalo prélevé dans neuf stations à Abidjan révèlent une constance dans les propriétés physico-chimiques. En effet, les paramètres mesurés étaient sensiblement les mêmes d'une station à une autre. Par contre, une étude effectuée sur la caractérisation physico-chimique du tchapalo dans plusieurs zones de Yamoussoukro a montré qu'il y'avait une variabilité entre les productions au sein de la même brasserie et d'une brasserie à une autre [20]. Selon ces auteurs, cette variabilité peut s'expliquer par le choix des variétés de la matière première, par les imperfections technologiques, par les intérêts financiers et par l'origine des brasseuses. Ce qui signifie que cette constance de qualité du moût sucré et du tchapalo ne peut être généralisée. Il est donc indispensable de définir les paramètres qui permettent de fabriquer un produit de qualité constante dans le temps et dans l'espace.

L'étude de la comparaison des propriétés physico-chimiques du moût sucré, produit intermédiaire et du tchapalo, produit fini a permis de mettre en évidence l'évolution de certains paramètres au cours de la fermentation. Ainsi, les paramètres comme le pH, l'acidité totale, la teneur en protéines et le taux de cendre n'ont pratiquement pas évolué au cours de la fermentation. Ces paramètres constitueraient les conditions initiales favorables au démarrage et à l'évolution du processus de la fermentation alcoolique. Le moût subit une fermentation lactique avant la fermentation alcoolique [8]. L'acide produit abaisse le pH et la plupart des microorganismes notamment les pathogènes sont incapables de se développer dans un tel milieu [21-24]; garantissant ainsi la qualité sanitaire du produit. Cependant ce milieu acide est favorable au développement des levures qui assurent la fermentation alcoolique sans modifier le pH, l'acidité totale, le taux de cendre et la teneur en protéines. La légère augmentation de 7,4 % de la teneur en protéines dans le tchapalo n'est pas négligeable sur le plan nutritionnel.

Maoura et al. [8] ont également trouvé que le pH n'évolue pas significativement au cours de la fermentation alcoolique de la « bili bili », bière traditionnelle tchadienne.

La grande différence entre le moût sucré et le tchapalo se situe au niveau de la teneur en sucres qui varie significativement au cours de la fermentation alcoolique. En effet, pendant cette fermentation, les levures utilisent les sucres fermentescibles qu'elles transforment en alcool et en dioxyde de carbone [25-27]. Lors du brassage, l'amidon est partiellement hydrolysé par les amylases. Dans le cas de la préparation du tchapalo, 86,1 % des sucres totaux présents dans le moût sucré ont été métabolisés. Cette importante hydrolyse des sucres serait la preuve de la présence dans le ferment de microorganismes producteurs d'hydrolase. En effet, les études faites sur les bières traditionnelles de sorgho en Afrique de l'ouest montrent que ces boissons constituent un biotope complexe composé de plusieurs genres et espèces de levures [3,4,28].

Dans le tchapalo les levures constituent la flore dominante donc, certainement ces levures posséderaient une activité α -amylasique comme celles qui interviennent dans la transformation du manioc [29]. La prédominance des levures est probablement due au fait qu'elles sont apportées par inoculation du ferment traditionnel dans le moût sucré pour assurer la fermentation alcoolique [6-8] alors que les bactéries lactiques sont apportées par l'environnement et le matériel utilisé. Cependant, nos résultats sont contraires à ceux de *Maoura et al.* [8] qui ont observé que les concentrations de la flore lactique et levurienne sont pratiquement identiques dans la « bili bili ».

Les bactéries lactiques présentes dans le tchapalo sont constituées de *Lactobacillus* et de *Leuconostoc*. Ces bactéries en faible nombre ne sont pas des contaminants fortuits car certains auteurs mentionnent leur présence dans les boissons traditionnelles africaines à base de céréale [2,8,22,30]. Ces bactéries feraient partie du milieu naturel du ferment. Cette faible charge pourrait être due à l'augmentation du taux d'alcool produit par les

levures au cours de la fermentation alcoolique [31]. Ces bactéries lactiques qui pourraient être les mêmes que celles qui ont assuré la fermentation lactique du moût, participeraient probablement au cours de la fermentation alcoolique, à l'hydrolyse importante des sucres non fermentescibles. La conséquence de cette consommation des sucres est la réduction de l'ESR et de la densité du tchapalo.

Tous les échantillons contiennent de la vitamine C. Le taux moyen est plus élevé dans le tchapalo (1,5mg/100 mL) que dans le moût sucré (1,1 mg/100 mL). Ce taux important peut contribuer à couvrir les besoins journaliers de l'organisme qui est de 10-75 mg/j [32,33]. Ces résultats sont similaires à ceux de *Taur et al.* [34] qui indiquent qu'au cours de la germination, une certaine quantité de vitamine C est synthétisée dans la graine de sorgho et également au cours de la fermentation alcoolique, d'où son augmentation dans le tchapalo.

Dans certaines productions artisanales, il est signalé la présence de méthanol. C'est un métabolite secondaire toxique de la fermentation. L'ingestion de 30 à 250 mL est mortelle [33,35,36] ; la norme ivoirienne fixe la valeur maximale de méthanol dans les boissons à 0,5g/L. Au-delà de cette valeur, la boisson est impropre à la consommation. La chromatographie en phase gazeuse réalisée sur les trente échantillons n'a décelé la présence ni de méthanol ni de propanol ; ce qui garanti dans ces conditions la sécurité du consommateur.

5. Conclusion

Les échantillons de moût sucré et de tchapalo analysés ont des propriétés physico-chimiques et microbiologiques statistiquement constantes indiquant une régularité de la qualité des bières produites et une maîtrise de la technologie par les brasseuses. La bière produite a une teneur en éthanol de 5,2 % vol alc, 1,5 mg/100 mL de vitamine C ne contient ni de méthanol ni de propanol mais contient des microorganismes qui peuvent altérer sa qualité pendant sa conservation. Il serait donc intéressant d'identifier les levures et les bactéries lactiques impliquées dans les fermentations lactique et alcoolique et d'étudier leurs propriétés technologiques. Les microorganismes qui produiront du tchapalo avec des caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques désirables seront sélectionnés pour fabriquer un ferment commercial.

Remerciements

Nous tenons à remercier Dr COULIBALY Mamadou et Professeur LOUKOU Y. Guillaume du Laboratoire National de la Santé publique pour leur aide ; les brasseuses traditionnelles qui nous ont permis de faire les prélèvements au cours de leurs productions.

Références

- [1] - V. GOTCHEVA, S. S.PANDIELLA, A. ANGELOV, Z. ROSKOVA, and C. WEBB, *International Journal of Food Science and Technology*, 36 (2001) 129-134
- [2] - J. J. ASSIEDU “ La transformation des produits agricoles en zone tropicale : approche technologique ”, Ed. Karthala et CTA, Paris (1991)
- [3] - A. V. D. A. KÜHLE, L. JESPERSEN, R. L. K. GLOVER, B. DIAWARA, and M. JAKOBSEN, *Yeast*, 18 (2001) 1069-1079
- [4] - E. S. NAUMOVA, I. V. KORSHUNOVA, L. JESPERSEN et G. I. NAUMOVA, FEMS (Federation of Europ. Microbiological Societies) *yeast research* 3 (2003) 177-184
- [5] - R. DERACHE, “Toxicologie et sécurité des aliments”, Ed. Technique et documentation Lavoisier (1989)
- [6] - A. K. YAO, N. KADIO, A. COULIBALY et G. N. AGBO, “in processing and industrial utilization of sorghum and related cereal in Africa. Proceeding of the OUA/STRC-SAFGRAD Regional symposium”, Ouagadougou, Burkina Faso, 22-26, Nov (1995) 55-60
- [7] - A. K. N'DA et S. COULIBALY, “ Etude comparative de procédés traditionnels de préparation d'une bière locale appelée tchapalo ”, 2^{ème} journées annuelles de la SOACHIM, Dakar-Sénégal, (1996) 40-46
- [8] - N. MAOURA, M. MBAIGUINAM, C. GAILLARDIN et J. POURQUIE, *Afrique Science*, 2(1) (2006) 69-82
- [9] - E. BREMOND, “Techniques modernes de vinification ”, Ed. Maison rustique, Paris (1957)
- [10] - S. TOMOHIRO, “Laboratory Manual for Food analysis”, Technical Cooperation Projet of Jomo Kenyatta (1990)
- [11] - M. M. BRADFORD, *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248-254
- [12] - M. DUBOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS. And F. SMITH, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350-356
- [13] - D BERNFELD, Academic press, Inc, New York, (1955) 149-154
- [14] - R. LE COQ, “Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles”, Ed. Doin (1965)

- [15] - C. M. BOURGEOIS et J. Y. LEVEAU, “ Technique d’analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires : Le contrôle microbiologique”, Ed. Lavoisier et Apria, Paris (1991)
- [16] - J. P. GUIRAUD, “ Microbiologie alimentaire ”, Ed. DUNOD, Paris (1998)
- [17] - B. BAHIRU, T. MEHARI and M. ASHENAFI, *Food Microbiology*, 23 (2006) 277-282
- [18] - J. C. De MAN, M. ROGOSA and M. E. SHARPE, *J. Appl. Bacteriol.* 23 (1960) 130
- [19] - J. V. MAYEUX, W. E. SANDRINE, and P. R. ELLIKER, *Journal of Dairy Sci.*, 45 (1962) 655
- [20] - N. D. AMANE, N. E. ASSIDJO, M. A. GBONGUE, K. BOHOUSSOU, P. CARDOT, *Agronomie africaine*, 17(2) (2005) 143-152
- [21] - GUIRAUD et GALZY, “L’analyse microbiologique dans les industries alimentaires”, Ed. Usine (nouvelle), Paris (1980)
- [22] - C. I. IWUOHA and O. S. EKE, *Food Research International*, 29(5-6) (1996) 527-540
- [23] - O. B. OYEWOLE, *Food control*, 8 (5/6) (1997) 289-297
- [24] - M. DESMAZEAUD, *Cahiers Agricultures* 5(5) (1996) 331-342
- [25] - M. MOLL, “Bières et Coolers” Ed. Technique et Documentation Lavoisier (1991)
- [26] - H. HESTOT, V. B. LADESCU et M. KRAUTTER, “La levure dans les industries alimentaires” Ed. Technique et Documentation Lavoisier (1994)
- [27] - M. J. TORIJA, N. ROZES, M. POBLET, J. M. GUILLAMON, A. MAS, *International Journal of Food Microbiology*, 80 (2002) 47-53
- [28] - S. SEFA-DEDEH, A. I. SANNI, G. TETTEH and E. SAKYI-DAWSON, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(5) (1999) 983-997
- [29] - D. R. DJOULDE, “Mise au point d’un ferment mixte destiné à la bioconversion des tubercules de manioc cyanogène”, Thèse de doctorat/Ph.D., Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro-industrielles (ENSAI) de l’université de Ngaoundéré, Cameroun (2004)
- [30] - A. I. SANNI, A. A. ONILUDU, I. F. FADAHUNSI and R. O. AFOLABI, *Food Research International*, 32 (1999) 163-167.
- [31] - K. C. THOMAS, S. H. HYNES and W. M. INGLEDEW, *Journal of Applied Microbiology*, 90 (2001) 819-828
- [32] - B. JACOTOT et J. C. LE PARCO, “Nutrition et Alimentation” Ed. Masson, Paris (1992)
- [33] - M. APFELBAUM, C. FORRAT et P. NILLUS, “Diététique et Nutrition” Ed. Masson, Paris (1995)
- [34] - ANONYME, “Toxicologie : Pharmacie, biologie, préparation de l’internat. Enseignement post-universitaire”, Ed. Groupe Liaisons SA (Coll. Le moniteur Internat) (1993)
- [35] - A. T. TAUR, V. D. PAWAR and U. M. INGLE, *Indian J. Nutr. Diet.*, 21 (1984) 129-136
- [36] - A. VIALA, “Elément de toxicologie”, Ed. Technique et Documentation Lavoisier (1998)