

**ORIGINAL ARTICLE**

## Procédé Traditionnel et Identification de la Flore Levurienne du *Lubo* ou Lie du Vin de Canne à Sucre (*Saccharum officinarum*) au Sein de 15 Ateliers de la Vallée du Niari au Congo

Philippe Diakabana\* / Michel Gadet Dzondo / Thierry Rogry Stéphane Moundosso / Michel Elenga / Jean Paul Latran Ossoko / Arnaud Wenceslas Geoffroy Tamba Sompila / Reyes Herdenn Gampoula / Roniche NGuié / Léa Nkounkou / Claudia Bassoumba

**Authors' Affiliation**

Département de Génie Microbiologie alimentaire, Institut National de Recherche en Sciences de l'Ingénieur, Innovation et Technologie, Brazzaville.  
Département de Génie Microbiologie alimentaire, Institut National de Recherche en Sciences de l'Ingénieur, Innovation et Technologie, Brazzaville

**Corresponding author**

Philippe Diakabana

**Email:**

[diakabanap@yahoo.fr](mailto:diakabanap@yahoo.fr)

**Funding**

None

**Abstract**

L'objectif du travail a consisté d'étudier le procédé traditionnel et identifier la flore levurienne du *lubo* ou lie du vin de canne à sucre (*Saccharum officinarum*) au sein de 15 ateliers de la vallée du Niari au Congo. L'équipement employé fonctionnant en discontinu, a permis d'assurer le processus de fermentation du *lubo* à une température de 35-45 °C. Le *lubo* mis en œuvre est un mélange constitué de moût frais extrait de tige de canne à sucre, de maïs partiellement moulu et de divers autres ingrédients selon les rituels. Les producteurs enquêtés utilisent au moins trois méthodes d'élaboration de *lubo* lesquelles se distinguent en fonction de la durée d'incubation. L'identification de la flore levurienne afférente a été obtenue moyennant l'étude sur des échantillons de lie prélevés en milieu réel, transportés frais au laboratoire à Brazzaville pour faire l'isolement des cellules de levure sur milieu spécifique gélosé de Sabouraud chloramphénicol. La purification d'isolats a été effectuée par repiquage en milieu gélosé de moût de canne à sucre. Les résultats d'analyse de trois isolats (MT-L1, MT-L2 et MT-L3) sélectionnés sur la base de repiquages et de rapidité de leur apparition sur moût gélosé, révèlent qu'il s'agit des colonies de microorganismes unicellulaires, ovoïdes et se reproduisant par bourgeonnement. Ces trois isolats identifiés sont différenciés d'une part par la concentration cellulaire de la colonie qui varie respectivement de 17 à 32 et à 18 x 10<sup>6</sup> de cellules/mL, et d'autre part par la taille et la forme cellulaires. Cette distinction indique l'existence de plusieurs souches de levure évoluant dans le *lubo* du vin de *lungwila*.

**Practical application**

La méthode étudiée peut être employée pour concevoir l'équipement de propagation cellulaire de culture de levure pure de terroir et produire un inoculum adéquat nécessaire à ensemer un moût adapté dans un procédé de fermentation dirigée susceptible de produire un vin nouveau et régulier de canne à sucre.

**Key words:** Procédé traditionnel, méthodes d'élaboration de *lubo*, fermentation éthylique gazogène, moût gélosé, levure mésophile, reproduction par bourgeonnement.

**1. Introduction**

Le *lungwila* est un breuvage traditionnel de terroir à base de la canne à sucre (*Saccharum officinarum*), produit artisanalement dans le Bassin du Congo : Congo, Province du Bas-

Congo en République Démocratique du Congo, Angola et zone sud du Gabon (Huetz de Lemp, 2001 ; Safou & Ivembi, 2008). Le procédé traditionnel de production de *lungwila* repose sur trois étapes principales : la préparation de la lie

appelé localement « *lubo* », la fermentation du moût de canne à sucre et le soutirage du vin (Diakabana *et al.*, 2014).

Ce breuvage des terroirs très prisé des consommateurs locaux est aussi exporté vers des localités de grande consommation (Diakabana *et al.*, 2014) où il est vendu comme boisson de rue (Safou & Ivembi, 2008). Il présente des potentialités économiques intéressantes de la filière de canne à sucre et pourrait également être commercialisé avec succès sur les marchés régionaux, nationaux et internationaux (Luzietosso Nguala *et al.*, 2000).

La production d'un bon vin de *lungwila* repose surtout sur la qualité de lie utilisée pour fermenter le moût de canne à sucre, car le procédé de fermentation traditionnelle fait intervenir des microorganismes divers (Moukengue, 2018 ; Kimami Mpirampou, 2019 ; Koumba Taraoré, 2020 ; Lepengue *et al.*, 2020) notamment des bactéries et des levures (Ouamba-Nouara, 2009) permettant la conversion de saccharose principalement en éthanol et divers métabolites secondaires. Les différentes espèces microbiennes présentes dans la lies se trouvent en compétition et engendrent d'autres fermentations qu'éthylique, en agissant défavorablement sur le rendement de production d'éthanol et la qualité organoleptique du vin (Ameyapoh *et al.*, 2006).

Dans le contexte de la production du vin de canne à sucre à processus de fermentation dirigé, le présent travail dans lequel les différentes méthodes d'élaboration de *lubo* sont analysées ainsi que sa composition en levure en vue de sélectionner la meilleure souche présentant de bonne qualité olfactive et probiotique.

Ce travail vise à recenser les différents procédés traditionnels d'élaboration de la lie du vin de canne à sucre des ateliers enquêtés, de

déterminer les facteurs liés à la bonne réussite de son élaboration, d'identifier la flore levurienne impliquée et de déterminer la densité cellulaire des colonies d'isolats de levure sélectionnés.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1.1. Matériel biologique

En vue de l'élaboration du moût gélosé, la tige de canne à sucre utilisée pour extraire le jus sucré a été récoltée d'un jardin dans le quartier Diata, arrondissement 2 Makélékélé du département administratif de Brazzaville, capitale administrative du Congo et lieu du laboratoire d'expérimentation.

Pour la préparation du moût gélosé nécessaire au repiquage d'isolats de levure du *lubo* obtenus à partir d'un milieu sélectif de Sabouraud chloramphénicol, la tige mûre de canne à sucre, hybride local (Ouamba-Nouara, 2009), utilisée pour extraire le jus sucré a été récoltée dans la même localité que celle précédemment mentionnée.

Les échantillons de *lubo* analysés, une lie riche en microorganismes fermentatifs, provenaient des producteurs de quatre localités du département administratif de la Bouenza au Congo, notamment: Kingoma ou Socoton, Matembo, Nkayi et Kiossi. Ces localités ont été choisies pour leur réputation dans la grande production et l'exportation du bon vin de *lungwila* dans la vallée du Niari (Diakabana *et al.*, 2014).

### 2.1.2. Matériel chimique

L'ensemble des produits et réactifs utilisés en laboratoire sont présentés comme suit : la gélose nutritive pour préparer le milieu solide de moût de canne à sucre; la gélose de Sabouraud chloramphénicol 0,005% pour isoler spécifiquement les levures et moisissures; l'alcool

éthylrique à 95 °GL de l'eau de javel (marque Colgate-Palmolive Cameroun, BP 1083, Douala).

## **2.2. Méthodes**

### **2.2.1. Enquêtes en milieu réel de production de vin de canne à sucre**

La population cible était constituée de producteurs de vin de canne à sucre installés dans 15 localités du département administratif de la Bouenza, dans la vallée du Niari, en République du Congo.

#### **2.2.1.1. Echantillonnage**

L'échantillonnage a été effectué sur 15 ateliers de production de vin de canne à sucre, dans le département administratif de la Bouenza, repartis de la manière suivante: huit ateliers dans la localité de Kingoma, trois à Matembo et Nkayi, et un à Kiossi.

La collecte d'informations a été réalisée sur les sites d'enquête à partir d'un questionnaire et d'entretiens individuels de la population répertoriée. Les questions posées par l'enquêteur ont porté sur l'identité des producteurs, les activités exercées, les ingrédients utilisés pour l'élaboration de la lie de vin de canne à sucre, les conditions d'incubation de *lubo*, le nombre de cycles d'utilisation de la lie, la période propice de préparation de la lie.

### **2.2.2. Collecte et transport d'échantillons de lie ou lubo**

Chaque échantillon de *lubo* a été récolté dans une bouteille en plastique stérile de 300 mL (chargée à moitié pleine). L'opération a été effectuée à l'aide d'un gobelet et d'un entonnoir stériles, un jour après soutirage de vin, tout en prenant soins d'écartier la couche superficielle de la lie. L'échantillon récolté a été immédiatement conservé au réfrigérateur.

Après leur récolte, des échantillons rafraichis de lie ont été transportés au laboratoire de Microbiologie alimentaire de l'INRSIIT (Institut National de Recherche en Sciences de l'Ingénieur, Innovation et Technologie). Ces échantillons ont été immédiatement stockés au réfrigérateur après dégazage en attendant leur emploi.

### **2.2.3. Isolement des levures**

L'isolement a consisté de disperser toutes les cellules de souches levuriennes présentes dans chaque échantillon de *lubo* à la surface d'un milieu de culture gélinifié, de manière à ce qu'après culture, elles donnent des colonies bien distinctes.

Toutes les manipulations ont été effectuées dans une zone aseptique, dans un rayon de 15 à 20 cm autour de la flamme d'un bec de Bunsen. Tous les matériels et les milieux de culture utilisés ont été stérilisés au préalable.

#### **2.2.3.1. Préparation des milieux de culture solide**

L'isolement des souches de levure a été réalisé sur un milieu sélectif de la gélose de Sabouraud-Chloramphénicol et la purification effectuée par repiquages successifs sur gélose de moût de canne à sucre.

##### **2.2.3.1.1. Milieu spécifique gélose de Sabouraud Chloramphénicol**

Après sa stérilisation, la gélose de Sabouraud enrichie de 0,005 % Chloramphénicol (Ganesan & Nallaiappan, 2014) a été utilisée pour isoler spécifiquement les levures impliquées dans la fermentation spontanée du moût de canne à sucre. Le choix de ce milieu a été motivé par son pouvoir sélectif qui favorise la croissance de levures et moisissures mais inhibe celle des bactéries.

### **2.2.3.1.2. Préparation du milieu agar de moût de canne**

La préparation du milieu gélosé de moût de canne a consisté à préparer du moût de canne à sucre et le mélanger à de la gélose nutritive.

#### **Préparation du moût de canne**

Le moût de canne a servi d'une part à la préparation du milieu de culture de moût gélosé de canne à sucre pour le repiquage assurant le triage des isolats de levure et d'autre part à la préparation de la gélose en pente en tubes servant à la conservation des souches pures. La préparation du moût de canne a été effectuée en deux étapes : i) l'extraction du moût de canne à sucre à partir de la tige mûre de canne à sucre récoltée dans le quartier Diata de l'arrondissement 1 Makélékélé, département administratif de Brazzaville, a été effectuée par pilage au mortier de petits morceaux de épluchés de 5 cm de tige. Ces morceaux de tige de canne pilés ont été pressés à la main à travers une mousseline pour obtenir le jus ayant subi une clarification au moyen d'entonnoir muni d'un filtre. Toutes les opérations ont été conduites à l'aide du matériel propre ; ii) la caractérisation physicochimique du moût de canne à sucre a été effectuée par pH-métrie pour la mesure de pH et par réfractométrie pour mesurer la teneur en sucres exprimée en degré Brix (Diakabana *et al.*, 2023b).

#### **Mode opératoire pour la préparation du moût gélosé et versement en boîtes de Pétri**

Le milieu gélosé de moût de canne a servi à la purification, par repiquages successifs, des souches de levure préalablement isolées et à la conservation des souches pures.

Le mode opératoire a consisté à :

- ✓ prélever 100 ml de moût limpide de canne à standardisé à  $4,2 \pm 0,2$  °Brix ;
- ✓ ajouter 6 g de poudre de gélose nutritif et le mélange obtenu a été ensuite chauffé et remué régulièrement, puis porté à ébullition pendant 30 secondes ;
- ✓ stériliser la solution obtenue par autoclavage à 121°C pendant 15 min ;
- ✓ verser le liquide obtenu dans des boîtes de Pétri. Après refroidissement et solidification de la gélose en boîtes de Pétri à température ambiante, elles ont été stockées au réfrigérateur à environ 4 °C en attendant l'ensemencement.

#### **Mode opératoire pour la préparation de gélose en pente**

La gélose en pente a été obtenue en gardant le tube à essais contenant 8-10 mL de gélose de moût de canne à sucre, pendant le refroidissement, en position inclinée d'un angle de 30-45° par rapport au plan horizontal. La gélose contenue dans les boîtes de Pétri et celle en tubes en pente pour la conservation d'isolats après purification ont été ensuite stockées au réfrigérateur pour l'ensemencement.

### **2.2.3.2. Préparation des suspensions mère**

A cause de la grande viscosité des échantillons de *lubo*, une dilution avant l'ensemencement a été effectuée, notamment en diluant 1 mL de l'échantillon dans 9 mL d'eau distillée (dilution au  $1/10^{\text{ème}}$ )

### **2.2.3.3. Ensemencement sur gélose Sabouraud-Chloramphénicol 0,005%**

L'ensemencement a été réalisé par la méthode des quadrants et sa variante par épuisement, adaptée par Diakabana *et al.* (2023a).

#### **2.2.4. Sélection d'isolats de levure**

Après 24 à 72 h d'incubation, des colonies de levure ont apparues. Par une étude macroscopique (observation à l'œil nu des caractères cultureux et de diamètre des colonies), des colonies de levure séparées d'une distance d'au moins 1 cm de leurs voisines immédiates ont été répertoriées, ensuite récupérées pour purification (Diakabana *et al.*, 2023a).

#### **2.2.5. Purification des souches de levure sélectionnées**

La purification des colonies des souches de levure sélectionnées a été faite par repiquages successifs (Diakabana *et al.*, 2023a).

#### **2.2.6. Conservation des souches purifiées**

Les souches de levure isolées et purifiées ont été ensemencées sur la gélose inclinée en tubes par la technique de la pipette boutonnée stérile, ensuite stockées au froid à 4 °C pour la suite des manipulations (Ganesan & Nellaiappan, 2014).

#### **2.2.7. Identification**

L'identification a pour but de déterminer le genre et l'espèce auxquels chaque souche de levure appartient. Ne s'effectuant que sur des souches pures, elle est basée sur la détermination des caractères cultureux, morphologiques, physiologiques et le mode de reproduction.

##### **2.2.7.1. Étude des caractères morphologiques et cultureux des souches**

###### **Observation macroscopique**

L'étude macroscopique a été effectuée sur les colonies de souches préalablement isolées et de faire une présélection basée essentiellement sur leurs caractéristiques morphologiques (Diakabana *et al.*, 2023a), notamment : forme de la colonie, relief, contour, taille, surface, couleur, consistance, pigmentation et opacité.

La caractéristique olfactive (l'odeur) de la colonie a également été intégrée.

###### **Observation microscopique**

Cette étude a consisté en un examen à l'état frais sous microscope d'un prélèvement issu de chaque souche pure de levure afin de déterminer (Diakabana *et al.*, 2023a) :

- ✓ la forme des cellules constitutives (sphérique, ovoïde, allongée, ellipsoïdale) ;
- ✓ le mode de reproduction ou de division cellulaire (par bourgeonnement unipolaire, bipolaires) ;
- ✓ le mode de groupement cellulaire (isolé, en amas, en chaînette, en paires, etc.) ;
- ✓ la mobilité des cellules (mobile ou immobile).

Une ansée de la colonie de chaque souche pure, mise en suspension dans une goutte d'eau distillée stérile, a été montée entre lame et lamelle puis observée sous microscope optique.

##### **2.2.8. Évaluation de la densité cellulaire d'une colonie des isolats de levure**

L'évaluation de la densité cellulaire d'une colonie des isolats sélectionnés de levure a été réalisée par le comptage du nombre de cellules de levure, moyennant l'utilisation de la cellule de Malassez (Diakabana *et al.*, 2023), afin d'obtenir la concentration cellulaire d'une colonie d'isolat de levure testée.

##### **2.2.9. Analyse statistique des résultats**

Dans le cadre de la caractérisation morphologique d'isolats étudiés, les valeurs statistiques suivantes ont été considérées : moyenne, écart-type pour un intervalle de confiance inférieur ou égal à 0,1 % (Diakabana *et al.*, 2023). La méthode statistique modifiée basée sur la loi en cloche de Gausse-Laplace a été utilisée (Larrieu, 1988).

### 3. Résultats

Les résultats de ce travail ont porté sur les données d'enquête effectuée relativement sur l'activité du procédé d'élaboration de *lubo*, les méthodes employées, l'isolement et l'identification des souches de levure impliquées dans ce processus de transformation biologique.

#### 3.1. Données d'enquête afférentes au procédé traditionnel d'élaboration de la lie de *lungwila*

##### 3.1.1. Données d'enquête basées sur trois questions relatives au procédé

Les données d'enquête basées sur trois questions relatives à l'activité du procédé traditionnel d'élaboration de la lie de *lungwila* sont présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1:** Données d'enquête basées sur trois questions liées au procédé d'élaboration et à l'utilisation du levain

Questions sur le levain		Localités d'enquêtes				Total
		Kingoma	Matembo	Nkayi	Kiossi	
Nombre d'atelier enquêté	Réponse	8	3	3	1	15 (100 %)
	Oui	8	3	3	1	15 (100 %)
Utilisation du Maïs	Non	0	0	0	0	0 (0 %)
	Oui	0	0	3	1	4 (26,67 %)
Utilisation d'autres ingrédients	Non	8	3	0	0	11 (73,33 %)
	2 <sup>ème</sup> cycle	3	3	0	0	6 (40 %)
Cycle d'utilisation du <i>lubo</i> relative à la production du bon vin	3 <sup>ème</sup> cycle	5	0	3	1	9 (60 %)
	Saison froide	8	3	3	1	15 (100 %)
Période saisonnière propice	Saison des pluies	0	0	0	0	0 (0 %)

L'ensemble des producteurs enquêtés affirment de faire usage du maïs dans la fabrication et/ou l'amélioration de la lie.

L'utilisation d'autres ingrédients n'a été observée que chez les producteurs de Nkayi et de Kiossi représentant 26,67%. Parmi ces adjuvants on retrouve : i) les rhizomes d'ananas, pour améliorer les propriétés organoleptiques (le goût et l'odeur), ii) les rhizomes d'une plante de savane appelée localement « moutoumbi ou moutoumfi », pour renforcer l'efficacité du vin, iii) les nœuds de canne à sucre épluchés ou non et pré-séchés au soleil, apportant des ferments spécifiques au milieu, iv) le bois ou l'écorce de *Bridelia ferruginea*, appelé localement « Kihala », pour apporter des vertus aphrodisiaques, lutter contre la fatigue après consommation du vin et pour améliorer les propriétés organoleptiques (le goût etc.).

Par rapport aux conditions d'élaboration du *lubo*, des récipients à ciel ouvert sont employés, notamment des bidons plastiques découpés et des dames jeannes. Pendant l'incubation, ces récipients sont, soit enfouis dans de la bagasse ou exposés au soleil, soit installés dans de bâtiment servant quelque fois de cuisine.

### **3.1.2. Méthodes traditionnelles d'élaboration de *lubo***

Dans les localités enquêtées, les résultats montrent que les producteurs utilisent au moins trois méthodes d'élaboration de *lubo*; elles sont variables en fonction de la durée du cycle d'incubation du *lubo*. Ces méthodes sont distinguées en fonction de la durée d'incubation relative à l'élaboration de *lubo* : i) méthode à grande vitesse dans un premier cas, ii) méthode à vitesse moyenne dans un deuxième cas et iii) méthode à vitesse lente dans un troisième cas de figure.

#### **3.1.2.1. La méthode à grande vitesse**

La méthode à grande vitesse est caractérisée par une durée du cycle d'incubation courte. Cette durée d'incubation varie entre 1 et 3 jours (Figure 1), elle est employée dans les localités de Kingoma et Matembo.

La méthode consiste à mélanger deux à trois mesures quaker de maïs dont les 2/3 sont grossièrement moulus, cinq à dix litres de moût frais de canne à sucre et au moins un litre de *lubo* ancien. Ce mélange se fait dans un ordre précis : vieux levain, puis maïs et enfin le moût de canne à sucre. Cette méthode est nouvelle dans la zone de son utilisation.

#### **3.1.2.2. La méthode à vitesse moyenne**

La méthode à vitesse moyenne d'incubation du *lubo* est celle dont la durée du cycle d'incubation est moyenne. Elle est caractérisée par une durée d'incubation de *lubo* variant entre 3 et 4 jours (Figure 2). Cette méthode à vitesse moyenne est employée dans les ateliers visités au sein des localités de Nkayi et de Kiossi.

Elle consiste à incuber, pendant 3 à 4 jours, un mélange constitué : i) de grain de maïs à raison de 1 à 1,5 mesures quaker, dont les 2/3 de grain de maïs sont grossièrement moulu, et ii) du moût frais de canne à sucre (3 à 5 L), iii) avec ou sans ajout des nœuds de canne à sucre légèrement broyés. L'incubation se fait également dans un endroit chaud, à une température élevée.

Après soutirage du vin, le cycle d'incubation est terminé. Ainsi le *lubo* actif servant à d'autres cycles de fermentation œnologiques est obtenu. Cette méthode est plus ancienne et est de plus en plus négligée au profit de la méthode à grande vitesse.

Les deux premières méthodes sont souvent utilisées dans les ateliers enquêtés à Kingoma et Matembo, deux localités proches.

### **3.1.2.3. La méthode à vitesse lente**

La méthode à vitesse lente d'incubation du *lubo* est celle dont la durée du cycle d'incubation est longue, notamment variant entre 3-5 jours (Figure 3).

La méthode à vitesse lente est employée au sein des ateliers installés à Nkayi et Kiossi, deux localités voisines mais distantes des premières localités.

Les différents traitements du maïs sont réalisés avant le mélange. Il s'agit du trempage de grains de maïs pendant 2 jours, suivi d'un séchage durant 1 à 3 jours. Enfin une fraction équivalente du 2/3 de la quantité totale de grains de maïs (2 à 3 mesures quaker) est grossièrement moulue. L'ensemble du maïs ainsi traité est mélangé avec le moût de canne à sucre et d'autres adjuvants, variant selon les pratiques rituelles des producteurs. Le mélange est incubé par la suite pendant 3 à 5 jours dans un endroit chaud.

### **3.1.3. Conditions indispensables pour l'obtention d'un bon lubo**

Selon les différents producteurs interrogés, la réussite de la formation du *lubo* passe par :

- ✓ le respect des étapes de fabrication du *lubo*;
- ✓ l'utilisation du grain de maïs de bonne qualité de préférence provenant d'un long stockage post récolte d'au moins 4 à 6 mois;
- ✓ l'usage des autres ingrédients également de bonne qualité;
- ✓ un moût de canne à sucre de bonne pureté (riche en saccharose);

- ✓ un bon endroit de conservation à l'abri des infiltrations d'eau, dans un endroit isolé et sans dérangement.

## **3.2. Isolement et triage des souches de levure présentes dans le lubo de lungwila**

### **3.2.1. Isolement des souches de levures**

Après ensemencement d'aliquote de l'inoculum de *lubo* à la surface de la gélose Sabouraud-chloramphénicol, puis incubation à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 24 à 72 h, diverses colonies de levures ont été cultivées. La caractérisation des colonies qui se sont développées, par observation macroscopique, a permis de trouver cinq (05) types de colonies de levure suffisamment séparées de leurs voisines.

### **3.2.2. Purification**

Après les repiquages successifs, sur gélose de moût de canne à sucre, les cinq types de colonies isolées ont donné trois (03) souches pures de levure désignées respectivement par MT-L1, MT-L2, et MT-L3 (Figure 4).

Les trois cultures de souches pures de levure ont été repiquées sur la gélose en pente et conservées au réfrigérateur à  $4^\circ\text{C}$ , en attendant leurs utilisations ultérieures, notamment l'identification.

### **3.2.3. Identification**

L'identification des souches pures de levure a été effectuée à partir de la connaissance des caractères morphologiques, culturels et microscopiques, de densité cellulaire de colonie des souches étudiées.

#### **3.2.3.1. Observation macroscopique des colonies des souches pures de levure testées**

Selon l'observation macroscopique, les colonies des souches pures de levure testées présentent des caractères communs concernant l'allure du contour régulier, le relief bombé, l'aspect de la

surface lisse, la couleur blanchâtre, la consistance crémeuse et l'aspect opaque.

Des différences sur l'observation macroscopique des colonies ont été obtenues au niveau de la taille et la forme (Tableau 2).

### 3.2.4. Distinction cellulaire complémentaire des colonies des isolats testés

La distinction cellulaire complémentaire des colonies des isolats testés est définie par la mobilité des cellules et la concentration cellulaire des colonies examinées (Tableau 3).

**Tableau 2:** Caractères macroscopiques de souches de levure

Souches	Caractéristiques macroscopiques des colonies de souches de levure							
	Taille	Forme	Contour	Relief	Aspect	Couleur	Consistance	Opacité
MT-L1	Moyenne	Arrondie	Régulière	Bombé	Lisse	Blanchâtre	Crémeuse	Opaque
MT-L2	Moyenne	Ovoïde	Régulière	Bombé	Lisse	Blanchâtre	Crémeuse	Opaque
MT-L3	Petite	Arrondie	Régulière	Bombé	Lisse	Blanchâtre	Crémeuse	Opaque

Les trois souches étaient constituées des colonies qui cultivent rapidement en 24 à 48 heures. Elles sont peu extensives, caractérisées par une odeur intense.

#### 3.2.3.2. Observation microscopique de la colonie de souche purifiée de levure

Selon l'observation microscopique, chaque colonie de souche purifiée de levure révèle les caractéristiques morphologiques, notamment : la forme des cellules, leur mode de groupement et de division (Figure 5).

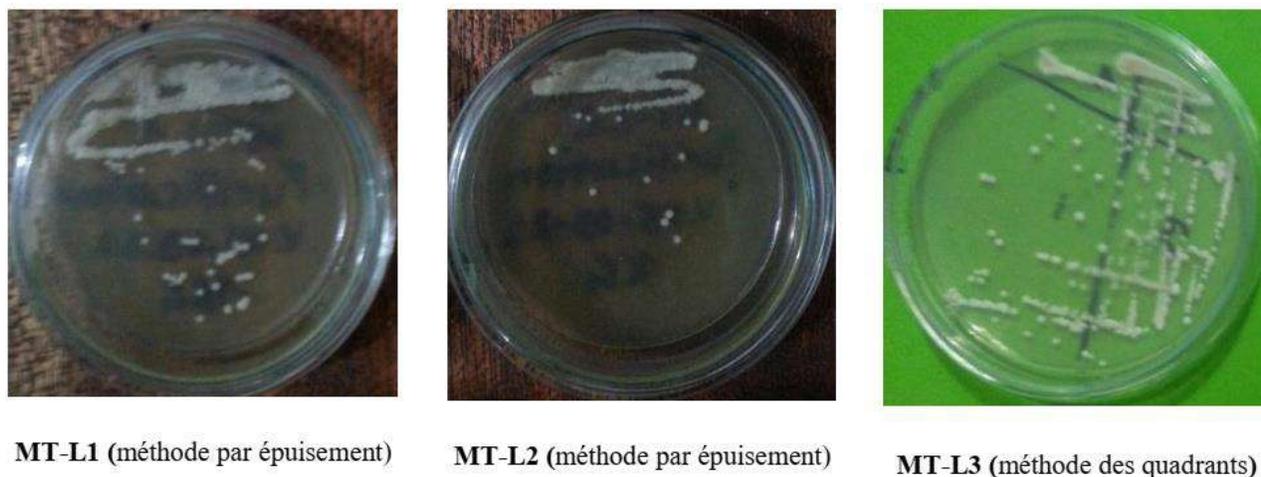
L'observation d'un aliquote de culture de chacun de ces isolats (MT-L1, MT-L2 et MT-L3) en fin de développement révèle la forme unicellulaire, présentant à certains endroits une division par bourgeonnement.

D'après l'observation microscopique effectuée à l'état frais sur les échantillons, toutes les cellules sont immobiles.

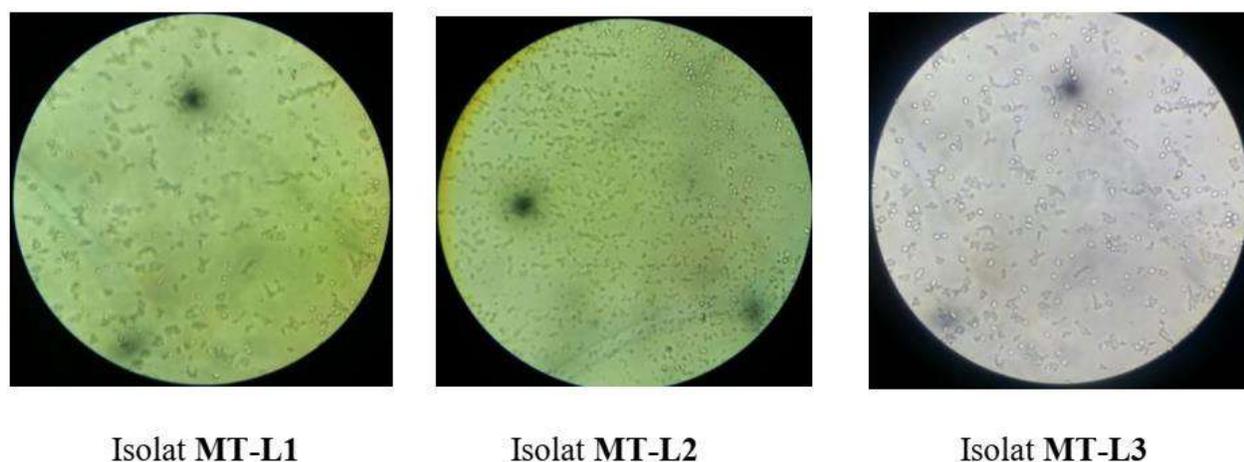
**Tableau 3:** Mobilité et concentration cellulaires des colonies examinées

Souche	Mobilité et concentration cellulaires de colonie	
	Mobilité des cellules	Concentration cellulaire par colonie ( $10^6$ cellules/mL)
MT-L1	Immobile	17
MT-L2	Immobile	32
MT-L3	Immobile	18

L'évaluation de la densité cellulaire de chaque colonie réalisée indique que la concentration des différentes colonies est variée. Elle est, en million de cellules/mL, de 17 pour la souche MT-L1, 32 pour MT-L2 et 18 pour MT-L3.



**Figure 1:** Colonies de trois isolats de souches pures de levure (MT-L1, MT-L2 et MT-L3) repiqués en boîtes de Pétri par méthode des quadrants et par épuisement.



**Figure 2:** Morphologie cellulaire des isolats MT-L1, MT-L2 et MT-L3 observées au moyen du camera de smartphone adapté à l'oculaire 10X du microscope optique, avec l'objectif 40X.

### 3.3. Discussion

Dans les trois méthodes de l'élaboration de *lubo*, l'incubation du mélange des ingrédients favorise la propagation cellulaire des microorganismes fermentant le milieu, notamment les cellules levuriennes (Stewart, 2017). Ce type d'incubation se faisant couramment à ciel ouvert, notamment

dans des bidons plastiques découpés et dans des récipients en verre (dame-jeanne) qui sont, soit enfouis dans la bagasse ou exposée au soleil, soit dans la maison servant quelque fois de cuisine relève de la pratique traditionnelle de vinification du raisin et de brasserie (Olav, 2009).

Les conditions d'incubation du *lubo* consistant à enfouir les contenants dans de la bagasse ou exposés au soleil, permettent de générer une température variant entre 30 à 40°C favorisant le développement des levures mésophiles (Abdel-Banat *et al.*, 2010). Le fait que ces bioréacteurs d'incubation de *lubo* fonctionnant en discontinu et à ciel ouvert soit chargé à plein afin de permettre à la lie de pouvoir évacuer la mousse sous forme de chapeau généré par le dégagement du CO<sub>2</sub> au cours du processus de fermentation éthylique explique l'efficacité du système de pouvoir stabiliser la pression générée par ce processus gazogène (Stewart, 2016 ; Stewart & Speers, 2019).

La durée d'élaboration du levain actif variant de 1 à 5 jours selon la méthode utilisée dans des conditions similaires de fermentation, notamment la capacité du récipient ou fermenteur, la température ou la saison d'élaboration du *lubo*, la quantité ou la concentration des ingrédients additifs détermine l'efficacité du procédé de fermentation (Dawn, 2016).

La grande vitesse relative à la première méthode par l'utilisation de *lubo* ancien, signifie qu'il apporte une grande population de levure spécifique à ce type de moût (Diakabana *et al.*, 2014). Le processus de fermentation selon cette méthode aurait probablement une phase de latence plus courte (Diakabana *et al.*, 2023).

Par contre, la durée relativement plus longue du processus fermentaire initié par l'utilisation des deux autres méthodes serait liée certainement à l'adaptation des souches de levure au milieu et aux conditions de culture (Akin, 2008).

Pour la deuxième méthode, les souches de levure proviendraient uniquement de la matière première notamment du grain de maïs

(Diakabana *et al.*, 2014), mais leur concentration de départ seraient faible.

Quant à la lenteur de la troisième méthode, la longue durée du processus de fermentation qu'elle initie serait probablement liée à la présence de certains adjuvant qui perturberaient notamment le pH du milieu, retardant l'adaptation des souches de levure (Akin, 2008).

L'intérêt d'utilisation du grain de maïs dans l'élaboration de *lubo* s'expliquerait par le fait qu'il apporte divers nutriments et ferments (Filofteia, 2010 ; Maximilian Michel *et al.*, 2017), notamment la flore levurienne au moût sucré conjuguée à celle apportée par le jus frais de canne à sucre (Stewart & Speers, 2019).

L'utilisation du grain de maïs provenant d'un long stockage post récolte d'au moins 4 à 6 mois justifie son intérêt à assurer l'augmentation du taux d'ensemencement du *lubo* en levure (Diakabana *et al.*, 2017).

Concernant la question sur le cycle de fermentation capable de produire un bon vin après élaboration ou changement de levain, 60% de producteurs affirment que c'est au troisième cycle qu'apparaît le bon vin, contre 40% favorables au deuxième cycle. En effet, pendant les deux premiers cycles d'utilisation du *lubo*, le *lungwila* produit présente le goût et l'odeur des ingrédients du levain. L'optimum des réactions enzymatiques nécessaire à la production du bon vin (Rezki-Bekki, 2014) serait atteint au troisième cycle de fermentation (Diakabana *et al.*, 2014).

Concernant l'enquête sur la technologie traditionnelle d'élaboration du *lubo*, trois méthodes de production de *lubo* souvent appliquées dans les localités enquêtées avec une répartition spatiale différente comme le révèle les procédés de production de beaucoup de breuvages traditionnels (Diakabana *et al.*, 2014),

affirmant l'hypothèse sur l'existence de plusieurs méthodes d'élaboration de levain de *lungwila* apportant plusieurs types de levure dans la vallée du Niari est validée (Maximilian Michel *et al.*, 2017).

En laboratoire, les cultures de souches pures de levure repiquées sur la gélose en pente et conservées au réfrigérateur à 4°C est nécessaire afin qu'elles gardent toutes leurs caractéristiques et limitent les possibilités de variations, en attendant leurs utilisations ultérieures (Diakabana *et al.*, 2023).

Quant au plan microbiologique, les résultats obtenus révèlent que la flore lévurienne identifiée dans les échantillons de *lubo* testés est pratiquement la même dans l'ensemble des échantillons en milieu réel (Roger & Garcia, 2001). Au regard des résultats culturaux et morphologique, cette flore est représentée probablement par le genre *Saccharomyces sp* ou *spp* (Kreger-Van, 1984), avec une concentration cellulaire moyenne variant entre  $17.10^6$  cellules/mL et  $32.10^6$  cellules/mL.

Les souches de levure isolées du *lubo* du vin de canne à sucre présentent une potentialité industrielle intéressante (Leveau et Bouix, 1993).

#### 4. Conclusion

La plus grande densité cellulaire évaluée dans une colonie de levure isolée du *lubo* de *lungwila*, est obtenue avec la souche MT-L2.

L'optimisation du procédé d'élaboration du *lubo* de *lungwila* nécessite l'ajoute du grain de maïs provenant d'une longue période post récolte et l'addition du *lubo* ancien, au jus frais extrait d'une tige de canne à sucre bien mûre. Elle est une voie potentielle pour bien manager le processus de fermentation de *lungwila*

#### Conflit d'intérêt

Les auteurs déclarent qu'ils n'ont nulle part de conflit d'intérêt pendant la soumission de l'article.

#### Ethique

Cette étude n'implique pas des tests sur humains et animaux.

#### Remerciements

Les auteurs remercient M. Loïc Jean Philléons Diakabana Kiyindou, diplômé de l'EAD (Ecole Africaine de Développement) de Brazzaville, pour sa participation aux illustrations du texte.

#### References

- Abdel-Banat, B.M.A., Oshida, H., Ano, A., Hoshida, H., Nonklang, S., and Akada R. (2010). High temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 861-867.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2248-5>
- Akin, H. (2008). Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins: modélisation et interprétation métabolique. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse: 136 p
- Ameyapoh, Y., Workpor, K. and de Souza C. (2006). Identification and selection of yeast strains for the efficient production of alcohol. *Journal of Science*, Vol.6 (1): 30-40.
- Castro, L.F., Bryant N. (2021). Laboratory-scale study of the effect of wort gravity, international bitterness unit levels, and serial repitching on viability of an ale yeast strain. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly* 58(2):78-85.  
<https://doi.org/10.1094/TQ-58-2-0414-01>

- Dawn, L.M. (2016). Brewing Fundamentals, Part 2: Fundamentals of Yeast Nutrition. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 53(1): 10-16.  
<http://dx.doi.org/10.1094/TQ-53-1-0302-03>
- Diakabana P, Dhellot J., Dinga Boudjoumba S., et al. (2014). Evaluation of the traditional technology of production of lungwila, a wine of sugarcane of Congo. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 8(4) : 1557-1569.
- Diakabana, P., Dzondo, G. M. Moussounga, J.E. Tamba Sompila, A.W.G., Mabika Madiélé A.B., Messo, L., Kobawila, S.C. and Louembé, D. (2017). Behavior of grains in the course of the smothering phase of the traditional process of malting of corn (*Zea mays sp.*) in the production of *lotoko*, a brandy of the Basin of Congo. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(11): 3541-3551
- Diakabana, P., Dzondo, G.M., Ossoko, L.P.J., Elenga, M., Ngampio, M.C., Bassoumba, C. & Mahoumi, H. (2023). Sélection et caractérisation d'isolats de levure à aptitude amylolytique provenant du malt de maïs (*Zea mays sp.*). *Journal of Food Stability*, 6 (1): 28-34.  
[DOI: 10.36400/J.Food.Stab.6.1.2023-0015](https://doi.org/10.36400/J.Food.Stab.6.1.2023-0015)
- Ganesan, S. & Nellaippan, O.G. (2014). Exploration of wild yeast strains for thermotolerance and ethanol production. *Research Journal of Chemistry and Environment*. 18 (1): 14-22.
- Huetz de Lempis, A. (2001). Alcoholic beverages obtained by fermentation of sap. In *Beverages and Civilization in Africa*. University Presses of Bordeaux, France: 258-261.
- Koumba Taraoré Jeanne Jukhel, (2020). Dynamique de la fermentation, recherche et identification des souches de *Bacillus cereus* dans le vin traditionnel à base de jus de canne à sucre (*Saccharum officinarum*). Mémoire de Master, ENSP, Université Marien NGOUABI, 43 p.
- Kimami Mpirampou, D. B. (2019). Caractérisation physicochimique et étude comparative de la flore fongique du ferment et de la boisson finie de Loungouila. Projet technique, Ecole Normale Supérieure Polytechnique. Université Marien NGOUABI, 55 p.
- Kreger-Van Rij, N. J. (1984). *The Yeast, a Taxonomic Study*, Elsevier Biomedical. Press, Amsterdam.
- Larpent, J.P. (1991). *Biotechnologie des levures*. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris : 97-127.
- Larrieu, J. (1988). Utilisation de la statistique en gestion de qualité. In: *Biotechnology*, Scriban R. coordonnateur; Technique et Documentation-Lavoisier, Troisième Edition, Paris : 661-679.
- Lepengue, A. N., Mokea-niaty, A., Ikabanga, D. U., et al. 2020. Effet de *Garcinia kola* (*Clusiaceae*) dans les processus de fermentation du vin de canne à sucre (*Saccharum officinarum* ; Poaceae) au Gabon. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 14(3) : 1074-1084.
- Leveau, J. Y. et Bouix, M. (1993). *Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel*. Ed. Tec & Doc Lavoisier. 612 p.
- Maximilian Michel, Tim Meier-Dörnberg, Fritz Jacob, Hubertus Schneiderbanger, Korbinian Haselbeck, Martin Zarnkow, and Mathias Hutzler. (2017). Optimization of beer fermentation with a novel brewing

strain *torulaspora delbrueckii* using response surface methodology MBAA TQ 54(1) : 23-33. <http://dx.doi.org/10.1094/TQ-54-1-0215-01>

Moukengue, H. (2018). Screening des micro-organismes à potentialités fermentaires d'un vin de canne à sucre (*Saccharum officinarum*). Mémoire de Master ; Ecole Normale Supérieure Polytechnique. 61p

Olav, N. (2009). Status of the yeast propagation process in breweries and some unanswered questions: in 122<sup>nd</sup> Anniversary MBAA Convention Abstracts of Oral and Poster MBAA TQ 46(3). [Doi:10.1094/TQ-46-3-0923-01](http://dx.doi.org/10.1094/TQ-46-3-0923-01)

Raherimandimby, R. (2004). Conception d'une cuve de fermentation. Etude comparative de la fermentation et de la distillation des Cannes à sucre, Ananas et Litchi. Mémoire d'ingénieur en Génie Chimique , Ecole Supérieure Polytechnique de l'Université d'Antananarivo, 82 p.

Rezki-Bekki, Meriem Amina (2014). Production de métabolites par les levures : caractérisation et identification des arômes et des alcools. Thèse de Doctorat en biotechnologie, Université d'Oran, 161 p.

Roger, P.A., Garcia, J.-L. (2001). Introduction à la microbiologie du sol. Polycopié de cours, Université de Provence, France.

Graham G. Stewart (2016). Brewing fundamentals, Part 1: Yeast - An Introduction to Fermentation. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 53(1): 3-9. <http://dx.doi.org/10.1094/TQ-53-1-0302-02>

Stewart, Graham G. (2017). Brewer's Yeast Propagation: The Basic Principles. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 54(3): 125-131.

<http://dx.doi.org/10.1094/TQ-54-3-1007-01>

Stewart, G.G., Speers, R.A. (2019). Yeast nutrition and metabolism: Effects on beer flavor. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 56(3): 76-92.

**Cite this paper as:** Diakabana, P., Dzondo, G.M., Moundosso, S.R.T., Elenga, M., Ossoko, L.J.P., Sompila, T.G.W.A., Gampoula, H.R., NGuié, R., Nkounkou, L. & Bassoumba, C. (2024). Procédé Traditionnel et Identification de la Flore Levurienne du Lubo ou Lie du Vin de Canne à Sucre (*Saccharum officinarum*) au Sein de 15 Ateliers de la Vallée du Niari au Congo. *Journal of Food Stability*, 7 (1): 35-48  
[DOI: 10.36400/J.Food.Stab.7.1.2024-003](https://doi.org/10.36400/J.Food.Stab.7.1.2024-003)