

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Biotechnologie et Microbiologie

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité Mixte de Recherche Qualisud

Relation entre la dynamique des populations microbiennes et les modifications physico-chimiques lors de l'élaboration de produits céréaliers fermentés : cas du gowé

Présentée par Bettencourt de Jesus Coxe MUNANGA

Le 12 décembre 2017

Sous la direction de Gérard LOISEAU

Devant le jury composé de :

Mme Sabine GALINDO, Professeur, Université de Montpellier

Mme Monique ZAGOREC, Directrice de recherche, INRA ONIRIS Nantes

Mr Djidjoho Joseph HOUNHOUIGAN, Professeur, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Mr André LEBERT, Professeur, Université de Clermont Auvergne

Mr Yvan LEGUERINEL, Professeur, Université de Bretagne

Mr Gérard LOISEAU, MCF, Montpellier SupAgro

Mr Christian MESTRES, Chercheur, CIRAD Montpellier

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



In memoriam

Ruth PAIVA

A mon père Miguel KIANGALA,

A ma chérie HeideLUIS,

A mes petites Rutiana MUNANGA et AlikeMakiesse MUNANGA

A mes frères et soeurs, pour leur présence et encouragement tout au long de ces années.

Coragem não é ter forças para continuar, mas continuar sem ter forças

(Avoir du courage c'est ne pas avoir des forces pour continuer,

mais, continuer sans avoir des forces)

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier grandement le gouvernement Angolais qui par l'intermédiaire de l'institut National de Gestion de Bourse d'Etude (INAGBE-Angola) a financé mon travail de thèse ainsi que le gouvernement français représenté par son Ambassade à Luanda.

Toutes mes reconnaissances à mon Directeur de thèse, Monsieur Gérard LOISEAU pour m'avoir donné l'honneur de travailler ensemble. La pleine confiance qu'il m'a accordée, sa présence, sa disponibilité, son soutien, son aide, ses conseils, son appui scientifique, son amitié et surtout son charisme et ses compétences ont été très importants non seulement pour l'élaboration de ce travail mais aussi pour ma formation académique pendant la formation en Angola et le master en France.

Je remercie grandement Monsieur Christian MESTRES mon Co-Directeur de thèse pour sa présence, sa disponibilité, son aide, ses conseils, son appui scientifique et sa patience tout au long de ma formation depuis le master, pour m'avoir formé pas à pas, pour m'avoir transmis tout son savoir avec beaucoup de rigueur.

Je suis reconnaissant de l'honneur qui m'ont fait Mme Monique Zagorec (Dr INRA, ONIRIS Nantes) et Mr Joseph HOUNHOUGAN (Professeur de Université d'Abomey-Calavi, Bénin) pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail ;

Je remercie également Mme Sabine GALINDO (Professeur, Université de Montpellier), Mr André LEBERT (Professeur de l'Université de Clermont Auvergne) et Mr Yvan LEGUERINEL (Professeur de l'Université de Bretagne Occidentale), d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger mon travail en tant qu'examinateur.

En suite mes remerciements s'adressent à la direction du CIRAD en générale et en particulier à, la Direction de l'UMR Qualisud en la personne de Monsieur Dominique PALLET et à toute l'équipe de l'unité, un grand merci.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse mes chaleureux remerciements et toute ma grande reconnaissance à Nawel ACHIR et à Philippe BOHUON pour leur appui scientifique à Joël GRABULOS, Brigitte MATIGNON, Laurent BERTHIOT et Gilles MOREL pour leur appui technique, la bonne humeur, leurs encouragements et leur disponibilité au quotidien.

Je tiens à remercier tous mes amis et collègues, Bany Baldaia, Claudio Lorena, Daniel Lucas, Ornelas, Osvaldo, Mussole, Elias, Famoso, Tchoca, Débora, Anastacia, Paco, Sinela, Ilunga, Kavungulica, Osleide, Anisia, Matondo, Daniel Ualace, Jéssica, Dora, Christelle, Fanny, Auriane, Adeline, Eric, Laura Huesca, Felicitas, Carla Vanessa, Didier-Axel, Brice, Tagro, Léthicia, Koumba, Larissa, Adriana, François, Lucelia, Nirina, Mathias Hounsun, Carol SACCA. Je garderais de vous les souvenirs de tous les moments amicaux que nous avons passés ensemble.

Mes remerciements vont aussi à toute l'équipe de Montpellier SupAgro pas seulement pour nous avoir accueillis depuis notre premier séjour en France, mais aussi pour la formation en Angola, en particulier Guillaume BEAU, Thomas MICHEL, Fathia FORT, Manuel DORNIER, Olivier LINK.

J'adresse mes sincères remerciements à toute l'équipe de l'UMR Qualisud du bâtiment 16 et plus précisément à : Marc, Marie-Christine, Renaud, Isabelle, Didier, Christophe, Isabelle, Benjamin et Isabelle Maraval.

Mes remerciements s'adressent également aux secrétaires de l'UMR Qualisud plus particulièrement à Marie Pierre et Jocelyne pour leur bonne humeur, leur efficacité et leur jovialité !

Mes vifs remerciements à l'égard du personnel technique de l'UMR Qualisud en particulier : Joël (non seulement pour son appui technique mais aussi pour son empathie et son encouragement), Adrien et Gilles.

Je m'exprime en portugais pour m'adresser particulièrement à ma famille : *o meu muito obrigado à meu pai e mentor Miguel KIANGALA pelas noites mal dormidas quando se tratasse da minha estadia fora da pátria, mas graças à Deus a missão foi cumprida. Tucha, minha esposa, a quem devo muito, obrigado pelo seu companheirismo, amor e apoio incondicional e por estar sempre presente. Às minhas filhas, Rutiana (Patroa), por ter aprendido a ser adulta antes dos 7 anos de idade para dedicar atenção à sua maninha Alíka Makiesse, amo-vos !*

Aos meus irmãos e primos, tenho a endereçar o meu profundo agradecimento por fazerem parte da minha caminhada. Aos meus sobrinhos, a quem muita das vezes não prestei atenção pelas viagens académicas, muito obrigado pelo apoio moral e compreensão. Como não podia deixar de ser, endereço o meu Axé à toda a família capoeirista de Angola e França em especial ao meu irmão Everson Leão, ao pessoal do grupo Capoeira Dendé Maruô e todos aqueles que sempre empurraram o barco.

Ao corpo directivo do ISTAM, e em particular ao Director Geral, Dr. Guilherme PEREIRA, aos docentes e trabalhadores não docentes os meus sinceros agradecimentos.

Ao Estado Maior General das Forças Armadas Angolanas, endereço os meus profundos agradecimentos pelo apoio prestado num momento que em se atravessavam grandes dificuldades financeiras, o meu MUITO OBRIGADO.

Finalment, je dirige tous mes remerciements à tous ceux qui, de près et de loïn, m'ont encouragé et ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Sommaire

Introduction générale.....	1
1 Chapitre I : Étude bibliographique.....	6
1.1 Les aliments fermentés.....	6
1.1.1 La fermentation.....	6
1.1.2 Les bénéfices de la fermentation.....	8
1.1.3 Les aliments fermentés amylicés consommés en Afrique.....	9
1.1.4 Le gowé.....	12
1.2 Le sorgho.....	15
1.3 Le maltage du sorgho.....	16
1.3.1 Le trempage.....	16
1.3.2 La germination.....	17
1.3.3 Le séchage.....	18
1.4 Les α-amylases.....	18
1.5 La fermentation lactique.....	19
1.5.1 Les bactéries lactiques.....	19
1.5.2 Le métabolisme énergétique des bactéries lactiques.....	20
1.5.3 Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques.....	24
1.5.4 Influence des facteurs environnementaux sur la croissance des bactéries lactiques.....	25
1.6 La fermentation alcoolique.....	30
1.6.1 Historique.....	30
1.6.2 Les levures et la fermentation alcoolique.....	31
1.6.3 Métabolisme énergétique des levures.....	32
1.6.4 Régulation du métabolisme carboné.....	35
1.6.5 Besoins nutritifs des levures en fermentation alcoolique.....	37
1.6.6 Les facteurs environnementaux influençant la croissance des levures.....	40
1.7 Modélisation de la croissance microbienne.....	42
1.7.1 Définition du modèle.....	42
1.7.2 Courbe de croissance microbienne en milieu non renouvelé.....	42
1.7.3 Modèles de croissance microbienne.....	46
1.7.4 Modélisation de cultures mixtes.....	52
2 Chapitre 2 : Matériels et Méthodes.....	59
2.1 Microbiologie.....	59
2.1.1 Les souches microbiennes.....	59
2.1.2 Les milieux de culture.....	59
2.1.3 Étude de la croissance des souches microbiennes.....	59
2.2 Analyses physico chimiques et biochimiques.....	60
2.2.1 Mesure de l'activité amylasique :.....	60
2.2.2 Dosage des sucres et des acides organiques par chromatographie liquide.....	61
2.3 Fabrication du gowé à l'échelle du laboratoire.....	61
2.3.1 La matière première.....	62
2.3.2 Le maltage.....	63
2.4 Modélisation.....	63
2.4.1 Modèles de croissance microbienne.....	63
2.4.2 Modélisation de la production d'acide lactique et d'éthanol.....	66
2.4.3 Modélisation de la valeur du pH de la farine de sorgho en fonction de la concentration en acide lactique.....	66
2.4.4 Modélisation de l'activité α -amylasique.....	67

3	Chapitre 3 : Résultats	72
3.1	<i>Première partie : Modeling lactic fermentation of gowé using lactobacillus starter culture</i>	<i>72</i>
3.2	<i>Deuxième partie : Modeling cereal starch hydrolysis during simultaneous saccharification and lactic acid fermentation; case of a sorghum-based fermented beverage, gowé.....</i>	<i>101</i>
3.3	<i>Troisième partie : Modeling mixed fermentation of the Gowé using selected Lactobacillus plantarum and Pichia kluyveri strains.....</i>	<i>129</i>
4	Conclusion générale et perspectives	156
5	Références bibliographiques	159

Liste des figures

Figure 1 : Représentation simplifiée de l'ensemble des réactions biologiques et des transformations intervenant lors de la fabrication du gowé (en vert les interactions positives, en rouge les interactions négatives les lignes continues, représentent les réactions bactériennes et les lignes pointillées représentent les réactions levuriennes).	4
Figure 2 : Le Gowé.....	12
Figure 3 : Diagramme de fabrication traditionnelle du gowé selon Vieira-Dalodé <i>et al.</i> (2007)	13
Figure 4 : Diagramme de fabrication modifiée du gowé proposé par Seïdou <i>et al.</i> (2011)...	14
Figure 5 : Épies et grains de sorgho.	16
Figure 6 : Fermentation du glucose chez les bactéries lactiques (Desmazeaud et Roissart, 1994).....	23
Figure 7 : Valeurs de pH maximal de croissance de <i>Lactobacillus</i>	27
Figure 8 : Schéma de la glycolyse.....	33
Figure 9 : Courbe de croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé.....	43
Figure 10 : Méthode de détermination de la durée de la phase de latence selon Pirt (1975)..	44
Figure 11 : Schéma de fabrication du gowé à l'échelle laboratoire selon Vieira-Dalodé <i>et al.</i> , (2007).	62

Liste des tableaux

Tableau 1: Aliments fermentés amylicés consommés en Afrique	11
Tableau 2 : Propriétés des trois groupes du genre <i>Lactobacillus</i>	20
Tableau 3: Températures de croissance des bactéries lactiques.	25
Tableau 4 : Valeurs du pH optimal de croissance et du pH final d'acidification de bactéries lactiques.....	26
Tableau 5 : Teneur de NaCl maximale de croissance de souches de bactéries lactiques isolées de lait de dromadaire.	30

Liste des abréviations et des sigles

[LA] : Concentration en acide lactique

[MP] : Concentration en Matière première

μ_{\max} : Taux de croissance maximal

μ_{opt} : Taux de croissance maximal optimal

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

HPLC : Chromatographie Liquide de Haute Performance

K_i : Constante d'inhibition

K_m : Constante de Michaelis-Menten

MP : Matière première

MRS : de Man Rogosa et Sharp

pH_{\max} : pH maximal

pH_{\min} : pH minimal

pH_{opt} : pH optimal

S : concentration en substrat

S_0 : concentration initiale en substrat

S_{nat} : Concentration en amidon natif

S_{sol} : concentration en amidon soluble

T_{\max} : Température maximale

T_{\min} : Température minimale

T_{opt} : Température optimale

UFC : Unité Formant Colonie

UV : Ultra Violet

$V_{\max_{\text{nat}}}$: Vitesse maximale d'hydrolyse de l'amidon natif

$V_{\max_{\text{opt}}}$: Vitesse maximale optimale d'hydrolyse de l'amidon

$V_{\max_{\text{sol}}}$: Vitesse maximale d'hydrolyse de l'amidon soluble

YEP : Milieu à l'Extrait de levure, à la Peptone

YEPG : Milieu à l'Extrait de levure, à la Peptone et au Glucose

γ : Gamma

λ : Temps de latence

Introduction générale

La fermentation ainsi que le séchage et le salage font partie des plus anciens procédés de conservation des matières premières alimentaires d'origine végétale ou animale. La fermentation des aliments est conduite par des microorganismes qui transforment des matières premières d'origine agricole périssables en aliments fermentés stables. L'augmentation de la stabilité des aliments fermentés s'accompagne souvent de modifications appréciées de leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles.

Initialement les procédés de fermentations mis en œuvre étaient empiriques et transmis oralement. C'étaient des fabrications à petite échelle, à faible coût utilisant les ressources locales pour de petits volumes de production comme cela persiste dans de nombreux pays, en particulier ceux en développement. Dans ce contexte, la qualité des aliments obtenus est variable, allant du meilleur au pire et pouvant mettre en péril la santé des consommateurs.

Les découvertes scientifiques de la fin du 19^{ème} siècle, particulièrement celles de L. Pasteur en microbiologie, ont rendu possible l'industrialisation de la fabrication d'aliments fermentés, elle-même soutenue par un accroissement constant de la demande par les populations citadines en augmentation. Dans un premier temps, les cuves de fermentation étaientensemencées à partir d'une cuve en fermentation. Ces fermentations étaient dirigées par une microflore sauvage non maîtrisée. Rapidement l'utilisation de souches microbiennes sélectionnées performantes s'est imposée pour être en mesure de maîtriser le processus de fermentation afin d'assurer la fourniture d'aliments sains, de qualité déterminée et constante. La conduite des différentes étapes de ces fabrications a été standardisée pour que les souches sélectionnées colonisent majoritairement et au plus vite la matière première au détriment des flores sauvages pour conduire au mieux les transformations physicochimiques attendues. Les premières industries à bénéficier de ces avancées furent celles de la brasserie, des produits laitiers et de la panification. Initialement, a prévalu la méthode du pied de cuve qui permet de multiplier les ferments localement puis ont été mis au point des procédés industriels capables de produire à grande échelle des ferments ou starters à haute densité de population viable, faciles à mettre en œuvre comme les levures ou les bactéries sèches actives.

La capacité des souches à coloniser rapidement le milieu sans altérer les caractéristiques sensorielles des aliments et leur aptitude au séchage ou à la congélation a été initialement le principal critère de sélection.

Il est apparu progressivement que la sélection des souches devait aussi prendre en compte des activités métaboliques particulières désignées sous le terme de propriétés fonctionnelles. Pour

les bactéries lactiques, il est possible de citer l'acidification, la production d'arômes ou celle d'exopolysaccharides. La capacité à sélectionner des souches possédant un potentiel technologique particulier a ensuite conduit à s'interroger sur les conditions d'expression de ce potentiel lors des fermentations dirigées. Or l'expression des potentialités technologiques d'une souche dépend de l'expression de son patrimoine génétique, de son activité métabolique, du niveau d'activités d'enzymes spécifiques qui sont directement modulés par son environnement, à savoir les propriétés physico-chimiques de la matrice alimentaire et les paramètres de conduite de la fermentation.

La modélisation de la cinétique de croissance des souches microbiennes, de leurs activités métaboliques et des transformations biochimiques qui interviennent au sein de la matrice alimentaire lors des fermentations en différentes situations est une voie de recherche récente qui permet de représenter, comprendre et simuler la croissance des différentes souches microbiennes participant aux fermentations et l'impact de leur croissance sur la qualité des aliments fermentés produits. Alors qu'initialement (hormis le yaourt) les travaux ont porté majoritairement sur des fermentations conduites en souche pure, il est rapidement apparu qu'il y avait un champ de recherche très peu exploré, à savoir celui de la maîtrise des fermentations mixtes menées par des associations de souches microbiennes qui interagissent pour former une communauté microbienne dont le fonctionnement lors de la fermentation assure la qualité des aliments fermentés. Plusieurs filières de production sont concernées comme la panification, l'œnologie, les produits laitiers, le café, le cacao, etc. La fourniture de starters constitués de mélange de souches microbiennes agissant en même temps ou séquentiellement permettrait de mieux maîtriser la qualité des productions et d'en élargir la gamme. A un niveau plus vaste, beaucoup d'aliments fermentés produits traditionnellement dans les pays du sud à petite échelle devront l'être à l'échelle industrielle pour répondre à la demande des populations des grands centres urbains. Cependant la grande majorité de ces aliments ne peut être fermentée que par des associations de souches. Il faudra donc être capable à l'avenir de proposer des starters microbiens constitués de différentes souches ou espèces et d'en définir les meilleures conditions d'utilisation. Le recours à la modélisation est une voie prometteuse pour arriver à ces résultats car elle doit permettre de choisir les souches les mieux adaptées et de définir les meilleures conditions de leur utilisation.

Le travail de cette thèse va dans ce sens. Il a pour objectif général de proposer un modèle global de la fermentation du gowé, une boisson traditionnelle consommée au Bénin, à base

d'un mélange de farine de sorgho malté et non malté, fermentée par des bactéries lactiques et des levures.

Les objectifs spécifiques sont :

- Modéliser la croissance des souches microbiennes ;
- Modéliser l'activité amylasique, et les concentrations en oses simples au cours de la fermentation ;
- Modéliser l'effet de la température sur la solubilisation de l'amidon.

La démarche de modélisation repose sur une représentation simplifiée de l'ensemble des réactions biologiques et des transformations nécessaires à l'obtention d'un gowé de bonne qualité (figure 1). Cette représentation a été construite à partir du diagramme de fabrication communément admis du gowé. Elle permet l'identification de blocs qui correspondent chacun à des paramètres caractérisant l'état d'avancement de la fermentation à une température donnée. Chaque bloc correspond à la modélisation d'un paramètre. La combinaison de tous les blocs aboutissant à la construction du modèle global de la fermentation du gowé. Pour atteindre ces objectifs, le travail a été divisé en trois parties présentées sous forme de publications pour valoriser au mieux les résultats obtenus.

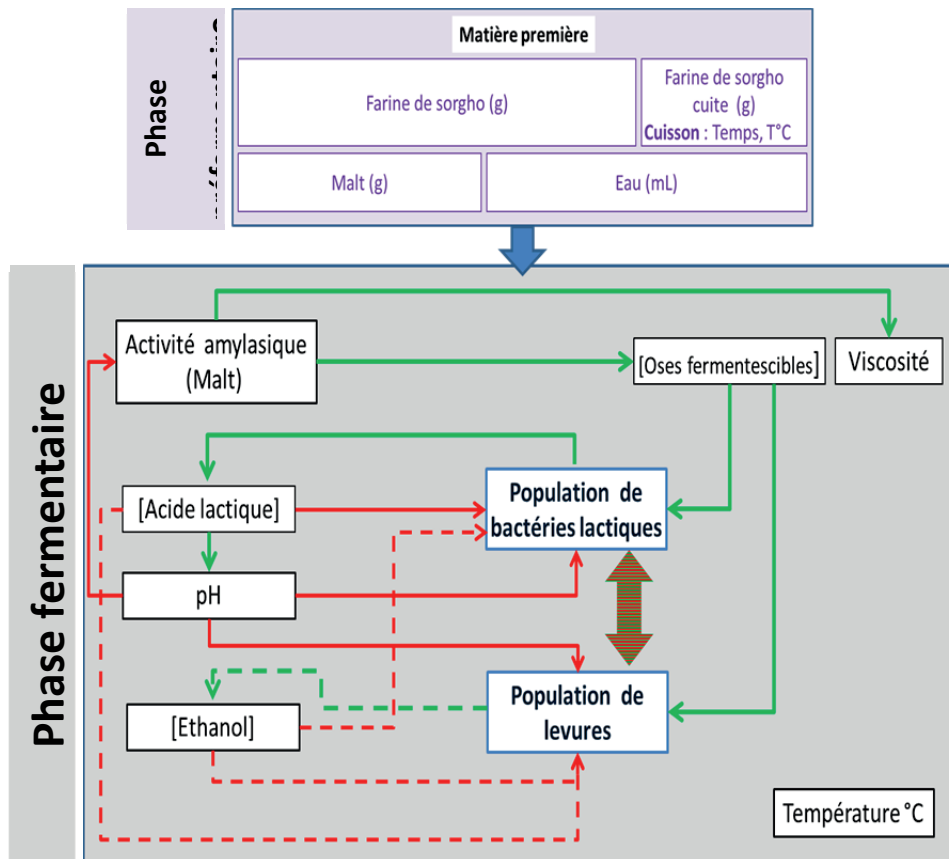


Figure 1 : Représentation simplifiée de l'ensemble des réactions biologiques et des transformations intervenant lors de la fabrication du gowé (en vert les interactions positives, en rouge les interactions négatives les lignes continues, représentent les réactions bactériennes et les lignes pointillées représentent les réactions levuriennes).

1^{ère} partie : Elle a pour objectif la modélisation de la fermentation lactique et de son impact sur le pH du gowé. Cette première partie est l'occasion de présenter la démarche de modélisation utilisée pour l'ensemble des populations microbiennes intervenant dans la fabrication du gowé. Le modèle primaire de Rosso (1995) a été utilisé pour décrire l'évolution du nombre de cellules des populations bactériennes. Selon le gamma concept, la modélisation secondaire de la croissance a été réalisée en mobilisant le modèle cardinal (CTPM) de Rosso *et al.*, (1995) pour déterminer l'impact de la température, du pH Le modèle d'inhibition de Coroller *et al.*, (2005) a été mobilisé pour modéliser l'impact de la concentration en acide lactique indissocié sur la croissance des souches lactiques. La diminution du pH du gowé en fonction de la production d'acide lactique par les bactéries lactiques a été modélisée. Le modèle global a été construit en implémentant les différents modèles cités précédemment. La validation de ce modèle a été réalisée lors de fabrications à petite échelle de gowé mettant en jeu de la matière première décontaminée par irradiation.

2^{ème} partie : L'objectif est ici de modéliser l'hydrolyse de l'amidon catalysée par l'alpha amylase du malt de sorgho et d'agréger ce modèle à celui de la fermentation lactique obtenu précédemment. La modélisation de l'activité amylasique a été basée sur le gamma concept en mobilisant le modèle cardinal (CTPM) modifié pour modéliser l'impact du pH et de la température sur l'activité amylasique. L'hydrolyse de l'amidon natif et/ou gélatinisé a été modélisée en prenant en compte à la fois l'inhibition non compétitive de l'activité amylasique par le glucose et le maltose, et l'impact de la cuisson de la farine de sorgho sur la solubilisation de l'amidon qui conditionne son hydrolyse. Finalement, l'agrégation de ces modèles à celui de la fermentation lactique a permis de construire un modèle prenant en compte la croissance des bactéries lactiques, l'évolution du pH, les conditions de précuisson de la farine sur l'hydrolyse de l'amidon, l'activité de l'alpha amylase qui conditionne les teneurs en maltose et en glucose du gowé. Ce modèle, a été testé lors de fabrications à l'échelle du laboratoire. Il a été utilisé pour simuler l'effet d'une inoculation plus importante et de l'élévation de la température, soit celle de la fermentation, soit celle de pré cuisson de la farine.

3^{ème} partie : L'objectif est de proposer un modèle global de la fermentation du gowé qui prend en compte la croissance d'une souche de *Lactobacillus plantarum*, celle d'une souche de levure commerciale de l'espèce *Pichia kluyveri*, l'activité amylasique du malt et la température de fermentation. Le modèle global a été testé lors de fabrications à l'échelle du laboratoire.

Ce manuscrit est composé de quatre chapitres : Une étude bibliographique, le chapitre présentant les matériels et les méthodes précède le chapitre résultats divisé en trois parties présentées sous forme de publications. Le dernier chapitre est la conclusion générale qui se termine par des propositions de poursuite de ce travail.

1 Chapitre I : Étude bibliographique

1.1 Les aliments fermentés

1.1.1 La fermentation

La fermentation est l'un des procédés de transformation des aliments parmi les plus anciens et serait originaire de la vallée de l'Indus selon Prajapati et Nair (2003), bien avant des écrits vieux de 8000 ans relatant la fabrication de fromage en Asie mineure. Ce n'est que plus tard que la fabrication du vin et de la bière est décrite par les égyptiens et les sumériens entre 4000 et 2000 avant notre ère puis celle du pain, à peu près à la même époque. Le mot fermentation dériverait du mot latin « *Fervere* » (bouillonnement). L. Pasteur a défini la fermentation comme «la vie sans l'air» (Bourdichon *et al.*, 2012).

De nombreux auteurs s'accordent à définir les aliments fermentés comme résultant de l'action de micro-organismes sur des matières premières alimentaires d'origine végétale ou animale conduisant à des transformations biochimiques dues à des activités enzymatiques microbiennes, rendant ces aliments plus stables, plus sûrs, et dotés de qualités sensorielles et nutritionnelles appréciées par les consommateurs humains (Steinkraus, 1997).

A l'origine, la production et la consommation d'aliments fermentés par les différentes communautés humaines a été fonction de leur situation géographique et du climat qui déterminaient les ressources disponibles localement, ce qui a conduit aussi à l'émergence de préférences alimentaires (Adebayo *et al.*, 2013). La diversité des aliments fermentés est très grande et concerne toutes les productions agricoles, qu'elles soient végétales ou animales, mais aussi les produits de la chasse et de la cueillette (Marshall et Mejía-Lorío, 2011). La diversité des produits s'explique par la diversité des matières premières utilisées mais aussi par la diversité des procédés mis en œuvre, par la diversité des espèces microbiennes impliquées qui peuvent intervenir seules ou en mélange, en conduisant le plus souvent une fermentation lactique ou une fermentation alcoolique voire alcaline.

La consommation d'aliments fermentés a toujours été influencée par la religion et par les traditions. Ces pratiques sont mentionnées dans des livres sacrés tels que la Bhagavad Gita, la Bible ou le Coran (Tamang et Kailasapathy, 2010). La tradition porte aussi bien sur les modes de consommation que sur les procédés de fabrication.

La révolution industrielle en Europe du milieu du 19^{ème} siècle a entraîné l'exode rural des populations des villages vers les grands centres industriels où elles se sont concentrées. Cet exode c'est accompagné de changements dans les systèmes de production alimentaire pour

répondre aux exigences des marchés en expansion. Cela a conduit au développement de fabrication à grande échelle d'aliments fermentés, dont les boissons alcoolisées. Dès lors, cette production à grande échelle d'aliments et de boissons fermentés a dépendu presque entièrement de l'utilisation de souches de micro-organismes sélectionnés, utilisées le plus souvent en culture pure en remplacement des flores sauvages qui conduisaient traditionnellement les fermentations. L'utilisation de starters sélectionnés a permis une meilleure gestion de production, la maîtrise de la constance de la qualité des aliments, dont la qualité sanitaire (Ross *et al.*, 2002).

Dans les pays développés et en particulier dans l'Union Européenne, l'intensification de la production industrielle d'aliments fermentés permet de répondre à la demande de prix bas et de sûreté sanitaire des consommateurs. Mais en parallèle sont apparus de nouveaux besoins de diversité, de conformités à des valeurs d'environnement et de patrimoine auxquels s'ajoute un engouement pour les productions locales et de terroir. Dans cette situation, des productions à faible échelle se maintiennent en revendiquant l'authenticité et la diversité de leurs productions comme celles des saucisses fermentées, des fromages au lait cru ou des vins.

Dans les pays du Sud, en particulier dans les pays africains, les aliments fermentés amylicés à base de céréales ou de racines constituent une part importante du régime alimentaire des populations (Yao *et al.*, 2009). Des aliments fermentés à base de poisson (Anihouvi *et al.*, 2012), de viande (Campbell-Platt, 1995), de lait (Mutukumira *et al.*, 1995), de fruits (Nyanga *et al.*, 2007), existent aussi mais sont moins consommés. Les aliments fermentés sont produits en milieu rural, à petite échelle au sein des familles ou dans des ateliers de petite taille avec une main-d'œuvre nombreuse. Ces productions ne nécessitent que de faibles investissements en infrastructures et en matériels avec de faibles coûts en fluides et en énergie. Les matières premières sont disponibles localement et à faible coût. La fermentation ajoute de la valeur aux matières premières agricoles, procurant ainsi un meilleur revenu et créant des emplois. Ces productions souffrent souvent d'un déficit d'image qui a pour origine le manque de maîtrise des différentes et nombreuses étapes du procédé de fabrication qui est souvent complexe, empirique et transmis de génération en génération, le plus souvent oralement. Dans ces conditions, la fermentation est mal maîtrisée, généralement dirigée par des flores microbiennes sauvages conduisant à des aliments fermentés de qualité variable, et sont parfois contaminés par des flores d'altération et/ou pathogènes qui limitent leur durée de vie et/ou qui nuisent à la santé des consommateurs. Dans certains cas, les aliments fermentés traditionnels sont délaissés au bénéfice d'aliments fabriqués soit dans les pays riches, soit localement dans

des unités industrielles et qui ont des atouts évidents en termes de qualité sanitaire, de standardisation, de conditionnement, de packaging et parfois de prix.

1.1.2 Les bénéfices de la fermentation

Lors de la fermentation d'une matrice alimentaire, la population microbienne se développe en tirant son énergie de l'oxydation des composés organiques réduits présents dans la matière première, généralement des glucides. Dans tous les cas l'oxygène n'étant pas l'accepteur final d'électrons, il n'intervient pas dans le métabolisme énergétique contrairement à son rôle lors de la respiration. Les principaux produits de la fermentation sont le CO₂, l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide propionique selon qu'il s'agisse de la fermentation lactique, acétique ou propionique dirigées par des bactéries. Les produits de la fermentation alcoolique principalement dirigée par des levures du genre *Saccharomyces* sont l'éthanol et le CO₂.

La fermentation conduit à l'augmentation de la population microbienne, à l'épuisement des substrats fermentescibles et à l'augmentation des teneurs des produits de la fermentation déjà cités mais aussi à des composés secondaires issus du métabolisme des souches microbiennes. D'autre part, les enzymes synthétisés par les micro-organismes agissent aussi directement sur les constituants de la matière première, en modifiant ses propriétés physicochimiques, nutritionnelles et sensorielles. L'ensemble de ces processus assure la qualité finale de l'aliment fermenté (Ross *et al.*, 2002).

La fermentation lactique est de loin celle qui est impliquée majoritairement dans la fabrication de la plupart des aliments fermentés qu'ils soient d'origine animale ou végétale alors que la fermentation alcoolique intervient pour un nombre restreint d'aliments fermentés, essentiellement en panification et pour la production de boissons alcoolisées. C'est lors de la fermentation lactique que se réalisent le plus de transformations biochimiques au sein de la matière première contribuant à la qualité des aliments fermentés. Aux bénéfices liés à la fermentation lactique s'ajoutent ceux liés aux opérations préfermentaires nécessaires pour assurer la colonisation majoritaire du milieu par les bactéries lactiques tel que le lavage et surtout le salage (Nout et Motarjemi, 1997).

Le principal bénéfice de la fermentation lactique est l'amélioration de la qualité hygiénique et la stabilisation d'une matière première périssable qui repose sur l'accroissement de sa résistance à des contaminations par des souches pathogènes responsables de toxi-infection alimentaire ou d'altérations limitant sa durée de vie. La protection des aliments fermentés

dépend principalement de la capacité des bactéries lactiques à acidifier le milieu et à produire suffisamment d'acide lactique voire d'acide acétique mais aussi des bactériocines et du peroxyde d'hydrogène (Svanberg *et al.*, 1992; De Vuyst et Vandamme, 1994; Podolak *et al.*, 1996).

Le bénéfice de la fermentation peut être la capacité des flores lactiques à réduire les composants toxiques tels que les aflatoxines (Mokoena *et al.*, 2006) et les composés cyanogènes (linamarine et méthyllinamarine) du manioc par exemple (Amoa-Awua *et al.*, 1996).

Le bénéfice de la fermentation peut être dû à la production de nombreux composés aromatiques surtout dans le cas des boissons alcoolisées par des souches de levures en particulier en œnologie et en brasserie (Carrau *et al.*, 2008). Concernant les bactéries lactiques, un exemple bien documenté est celui du yaourt (Cheng, 2010) et des fromages (Smit *et al.*, 2005)

Le bénéfice peut être nutritionnel via la biosynthèse de vitamines, d'acides aminés (Hugenholtz et Smid, 2002), à l'amélioration de la digestibilité des protéines (Lorri et Svanberg, 1993), de l'amidon (Reddy *et al.*, 2008), à la destruction de facteurs antinutritionnels (Martinez-Villaluenga *et al.*, 2008; Adeyemo et Onilude, 2013). Le bénéfice peut être thérapeutique associé à la présence de probiotiques (Pinto *et al.*, 2006).

1.1.3 Les aliments fermentés amylacés consommés en Afrique

Les céréales constituent les plus importantes sources alimentaires de l'humanité. Les aliments à base de céréales sont la source majeure de nutriments, d'énergie, de protéines, de vitamines du groupe B et de minéraux pour la population mondiale (FAO, 2002; Vieira-Dalodé *et al.*, 2007). Les aliments fermentés amylacés consommés en Afrique sont à base de céréales ou de racine et de tubercules avec une place très importante pour le manioc dont la production mondiale est en tonnage la quatrième après celle du blé, du riz et du maïs et qui est de loin la plus importante en Afrique (Assanvo *et al.*, 2017).

Les aliments amylacés fermentés consommés en Afrique sont soit solides ou semi solides sous forme de bouillies ou de pâtes, soit liquides quand il s'agit des boissons alcoolisées ou non-alcoolisées. Le tableau 1 donne le nom des aliments fermentés amylacés à base de céréale ou de manioc parmi les plus consommés en Afrique (Santoyo, 2001; Yao *et al.*, 2009; Aka *et al.*, 2014). A noter que pour de nombreux aliments fermentés cités dans ce tableau, la matière

première utilisée n'est pas exclusive ni du produit, ni du pays de consommation. Ainsi l'ogi peut être produit avec du sorgho au Nigéria. La fermentation lactique est l'étape essentielle de la plupart des procédés de fabrication de ces aliments sauf pour les boissons alcoolisées. Pour certains de ces aliments les deux fermentations interviennent simultanément ou séquentiellement. La diversité des produits ne correspond pas toujours à une diversité des procédés de fabrication qui mettent en œuvre des opérations similaires mais conduites différemment. En général, les procédés de fabrication mettent en œuvre des étapes de nettoyage, de trempage, de broyage, de tamisage humide, de décantation, de fermentation et de cuisson. Dans de nombreuses fabrications est ajouté du malt qui constitue un apport d'amylases permettant la saccharification de l'amidon qui impacte l'acidification, la texture et le goût sucré des aliments. L'acidification due à la fermentation lactique n'est pas la seule à intervenir dans la production des aliments fermentés. Pour certains aliments, notamment des condiments, l'étape importante du procédé est une alcalinisation, c'est le cas du dawadawa consommé au Nigéria, à base de graines de néré (*Parkia Biglobosa*) fermentées par différentes espèces de *Bacillus* (Ikenebomeh *et al.*, 1986).

Tableau 1: Aliments fermentés amylics consommés en Afrique
à base de céréales ou de manioc.

Matière première	Nom de l'aliment	Micoorganismes	Type de produits	Pays de consommation
Maïs	<i>Kenkey</i>	<i>L. fermentum</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>C. krusei</i>	Pâte	Ghana, Nigéria
Maïs et/ou Manioc	<i>Banku</i>		Pâte	Ghana
Maïs	<i>Ogi</i>	<i>L. plantarum</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. lactis</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. mesenteroides</i> <i>L. casei</i> , <i>S. thermophilus</i>	Bouillie	Nigéria, Bénin,
Maïs	<i>Ogi-baba</i>	<i>L. plantarum</i> <i>S. lactis</i> <i>C. krusei</i> <i>D. hansenii</i>	Bouillie	Ghana
Maïs	<i>Mawè</i>	<i>Candida krusei</i> <i>C. glabrata</i> <i>K. marxianus</i>	Pâte	Bénin, Togo
Mil	<i>Ben-saalga</i>	-	Bouillie	Burkina-Faso
Maïs, Mil, Sorgho ou Manioc	<i>Uji</i>	-	Bouillie	Kenya
Manioc	<i>Agebelima</i>	-	Pâte	Ghana, Togo, Bénin
Manioc	<i>Gari</i>	-	Semoule	Ghana, Bénin, Togo, Nigéria, Sierra Léone, Côte d'Ivoire
Manioc	<i>Fufu</i>	-	Pâte	Nigéria
Manioc	<i>Attiéké</i>	-	Semoule	Côte d'Ivoire
Mil	<i>Kunun-zaki</i>	<i>L. plantarum</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. lactis</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. mesenteroides</i> <i>L. casei</i> <i>S. thermophilus</i>	Boisson non alcoolisée	Nigéria
Sorgho	<i>Gowé*</i>	<i>L. fermentum</i> <i>W. confusa</i> <i>L. mucosae</i> <i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>W. kimchii</i> <i>K. marxianus</i> <i>P. anomala</i> <i>C. krusei</i> <i>C. tropicalis</i> .	Boisson non alcoolisée	Bénin
Maïs	<i>Mahewu*</i>	-	Boisson non alcoolisée	Afrique du Sud
Mil	<i>Koko</i>	-	Boisson non alcoolisée	Ghana
Sorgho et /ou Mil Maïs	<i>Obiolor*</i>	-	Boisson non alcoolisée	Nigéria
Mil	<i>Masvusvu*</i>	-	Boisson non alcoolisée	Zimbabwe
Maïs et/ou Sorgho	<i>Pito</i>	-	Boisson alcoolisée	Nigéria, Ghana
Sorgho et/ou Manioc	<i>Burukutu</i>	-	Boisson alcoolisée	Nigéria
Sorgho ou Mil	<i>Dolo</i>	-	Boisson alcoolisée	Burkina-Faso
Sorgho	<i>Tchoukoutou</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>Candida krusei</i> <i>Clavispora lusitaniae</i>	Boisson alcoolisée	Bénin
Sorgho et/ou Maïs ou Mil	<i>Tchapalo</i>	-	Boisson alcoolisée	Côte d'Ivoire
Sorgho et Maïs	<i>Kwete</i>	-	Boisson alcoolisée	Ouganda

*aliments avec du malt

Le gowé

Le gowé est une boisson non alcoolisée traditionnelle béninoise fabriquée à partir d'un mélange de farine maltée et de farine non maltée de maïs ou de sorgho, qui fermente spontanément pour donner une pâte sucrée et légèrement acide après cuisson (Adinsi *et al.*, 2014). Le gowé est consommé tel quel ou après dilution dans de l'eau avec addition de sucre et parfois de lait. Le gowé est produit localement, à petite échelle (Figure 2). Il est acheté dans la rue ou sur les marchés pour se désaltérer et/ou comme boisson énergétique (Adinsi *et al.*, 2015) ;

Différentes céréales sont utilisées pour fabriquer du gowé, comme le sorgho blanc, le mil et le maïs blanc mais les consommateurs préfèrent celui produit avec du sorgho rouge. La texture est un attribut essentiel de la qualité du gowé. Ainsi les consommateurs recherchent un gowé qui soit une pâte compacte mais moelleuse, qui ne colle pas aux doigts, ni aux dents ou au palais mais qui doit simplement fondre dans la bouche. Le gowé se conserve deux à trois jours à température ambiante, et jusqu'à une semaine à 4°C.



Figure 2 : Le Gowé

Le procédé traditionnel de fabrication du gowé est présenté figure 3 (Vieira-Dalodé *et al.*, 2007). Il comprend trois étapes : le maltage (6 jours), une première fermentation (12 h) et la deuxième fermentation (24-48h). Le maltage améliore la qualité nutritionnelle du produit tandis que la fermentation améliore sa qualité sanitaire. La principale contrainte du procédé traditionnel est le temps nécessaire pour le maltage ainsi que la maîtrise de sa réalisation qui, si elle est mal conduite, peut entraîner la contamination du malt par des mycotoxines. Cependant, la plupart des producteurs emploient une technique modifiée, qui consiste à fermenter de la farine de sorgho non maltée à laquelle on rajoute du sucre commercial pour obtenir le goût sucré naturel proche de celui du gowé traditionnel. Le temps requis pour produire du gowé selon la technique modifiée proposé par (Seïdou *et al.*, 2011) est de 3 jours (figure 4), au lieu de 6 à 8 jours selon le procédé classique.

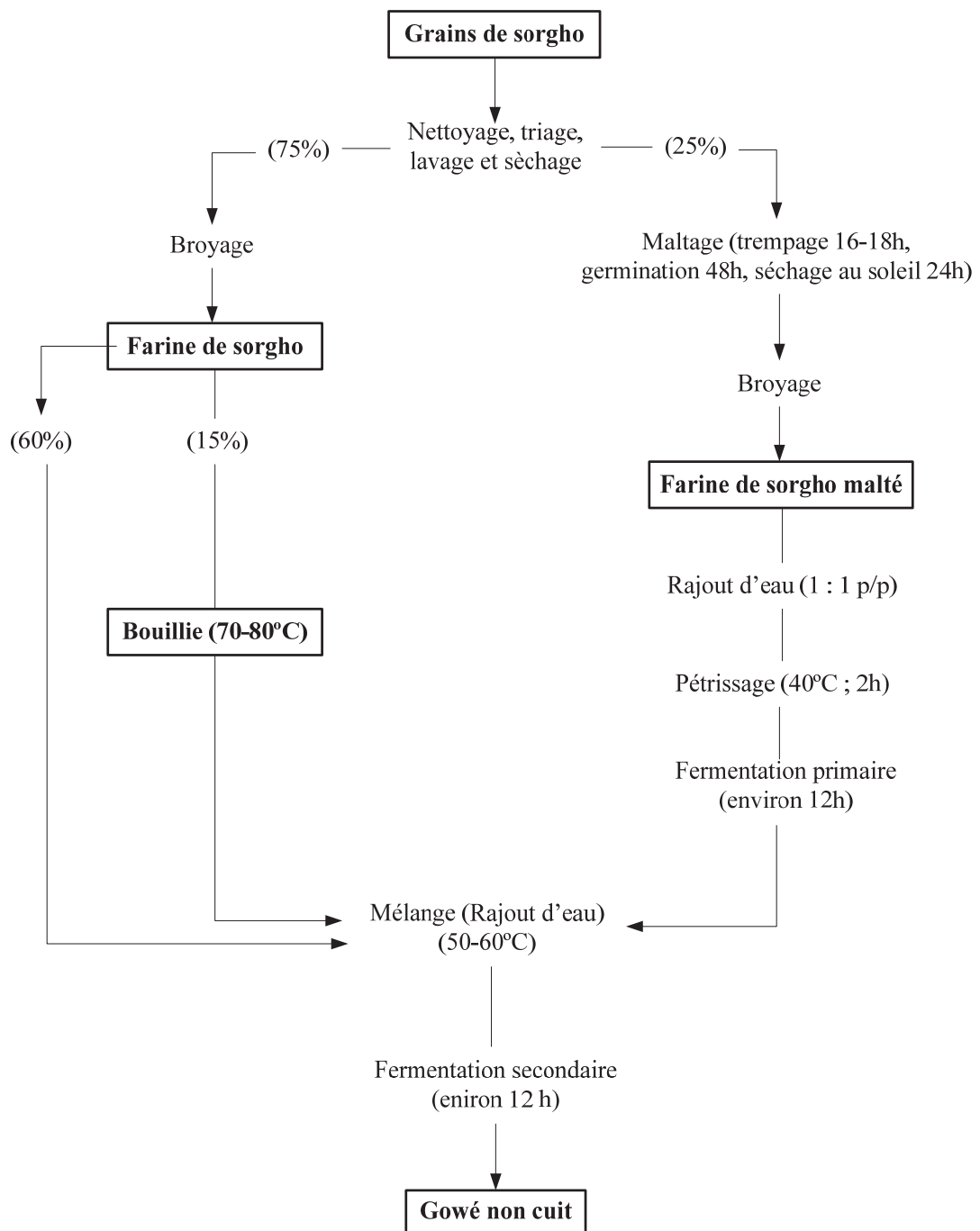


Figure 3 : Diagramme de fabrication traditionnelle du gowé selon Vieira-Dalodé *et al.* (2007).

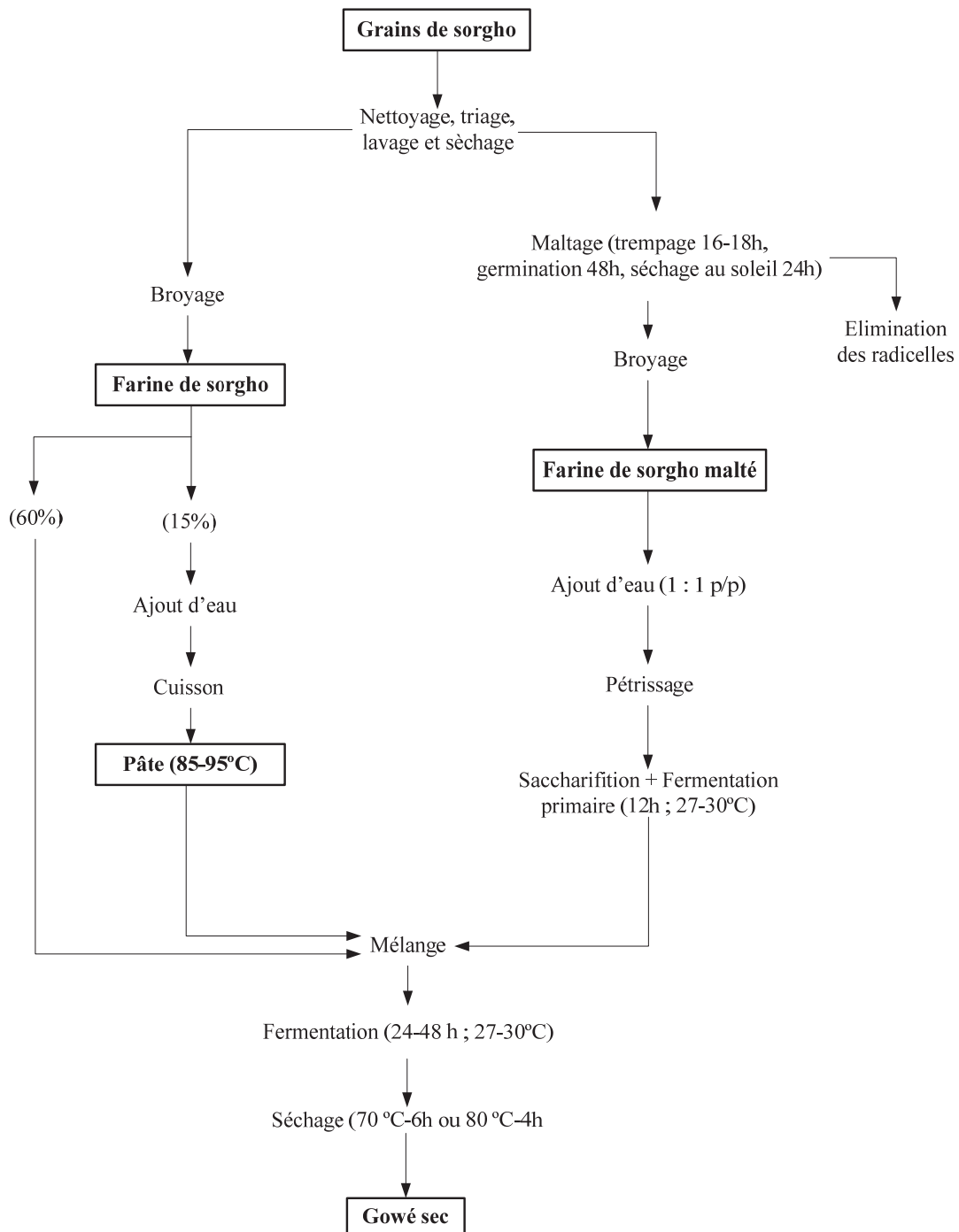


Figure 4 : Diagramme de fabrication modifiée du gowé proposé par Seïdou *et al.* (2011).

Vieira-Dalodé *et al.* (2007) ont inventorié la microflore présente à différents stades de la fabrication traditionnelle du gowé. Les deux étapes de fermentation du gowé sont conduites par une population microbienne mixte comprenant des bactéries lactiques et des levures. Les espèces lactiques dominantes, sont par ordre d'importance, *Lactobacillus fermentum*, *Weissela confusa* et *Lactobacillus mucosae*. Les espèces de levure *Kluyveromyces marxianus*,

Pichia anomala, *Candida krusei* et *Candida tropicalis*. *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia anomala* sont présentes majoritairement dans les huit premières heures de la première fermentation alors que les deux souches du genre *Candida* atteignent un niveau de population non négligeable plus tardivement. La population de *Pichia anomala* décroît fortement en fin de la deuxième fermentation alors que les trois autres espèces de levures se maintiennent à des niveaux de population identiques.

1.2 Le sorgho

Le sorgho (*Sorghum bicolor*) (figure 5), est une culture de climat chaud qui résiste à la sécheresse et aux maladies ce qui en fait une culture de base dans de nombreuses régions d'Afrique, d'Asie, et de certaines zones du Moyen-Orient (McKevith, 2004). Le sorgho est l'aliment principal dans de nombreuses régions d'Afrique. C'est la source principale d'énergie, de protéines, de minéraux et de vitamines pour des millions de personnes. Divers types d'aliments sont préparés à partir des grains entiers de sorgho comme par exemple des pains fermentés tels que l'*injera* éthiopien et le *kisra* sorte de crêpes à base de pâte fermentée consommées au Soudan. En Afrique de l'Est, des aliments cuits à la vapeur (couscous), pâtes fermentées et non fermentées (*ugali*, *akamu*, *tô*, *eko*, *kamu*, *koko*, *ogi*, etc.) et des boissons avec et sans alcool sont les produits les plus décrits dans la littérature (Michodjèhoun-Mestres *et al.*, 2005). Comme d'autres produits céréaliers, les aliments à base de sorgho ont une faible valeur nutritive. C'est essentiellement dû à la faible digestibilité des protéines du sorgho déficientes en lysine, thréonine et tryptophane et à la présence de facteurs antinutritionnels comme des tannins et des phytates qui interagissent avec les protéines, les vitamines et les minéraux, et de ce fait limitent leur disponibilité. Ces facteurs antinutritionnels sont responsables d'anémie et d'autres maladies alimentaires chez les gros consommateurs de cette céréale dans les pays du sud. Pour améliorer la digestibilité des protéines, diverses voies ont été étudiées pour réduire les teneurs en tannin et en phytates. Ces techniques incluent le maltage et la fermentation (Michodjèhoun-Mestres *et al.*, 2005). La fermentation est traditionnellement utilisée pour transformer le sorgho. Les produits fermentés sont bien acceptés et largement consommés. Les formes de consommation du sorgho varient d'un pays à l'autre. Les aliments faits à base de sorgho sont classés en trois grands groupes d'aliments. Ceux-ci incluent les aliments pâteux comme l'*ogi*, les bouillies comme le *koko* et les boissons dont certaines sont alcoolisées comme le *tchoukoutou* ou le *chapkalo* et d'autres non alcoolisées comme le *gowé* (Kayodé *et al.*, 2005). La fabrication de certains aliments met

en œuvre du malt de sorgho qui permet d'augmenter les teneurs en protéines hydrosolubles, en lysine, en méthionine, en sucre et aussi la disponibilité en fer, en calcium et en phosphore et de bénéficier de l'activité diastasique du malt.



Figure 5 : Épies et grains de sorgho.

1.3 Le maltage du sorgho

Le maltage est un procédé très ancien dont l'objectif est l'augmentation de la teneur en sucres solubles, en protéines solubles et en enzymes. Au cours du maltage, de nombreuses réactions biochimiques et physiologiques interviennent, induisant des transformations morphologiques (développement de l'embryon, des radicelles), la synthèse d'enzymes hydrolytiques (α -amylase, β -amylase, α -glucosidase, pullulanase, etc.) qui hydrolysent l'amidon et des protéases conduisant à des modifications de l'endosperme (protéolyse, dégradation des parois cellulaires, etc.) (Dziedzoave *et al.*, 2010). Le procédé de maltage comporte 3 étapes successives : le trempage, la germination et le séchage.

1.3.1 Le trempage

Le trempage du sorgho est réalisé à température ambiante (30°C) (Michodjèhoun-Mestres *et al.*, 2005). L'élévation de la température à 40°C dans les trois dernières heures entraîne une réduction de la longueur des radicelles de 25% jusqu'à 53% et des pertes de maltage ou pertes en matière sèche des grains de 4,5 à 7% (w/w). L'augmentation de la durée de la trempage de 16h à 40h favorise la synthèse des enzymes (Ajerio *et al.*, 1993). À l'inverse, un allongement de la durée de trempage peut conduire à la mort du germe par anoxie et au développement de moisissures potentiellement productrices de mycotoxines. En fin de trempage, la teneur optimale en eau des grains devrait être comprise entre 33 et 36% selon Agu et Palmer (1998).

L'aération des grains de sorgho pendant la trempe conduit à une augmentation du pourcentage de grains germés, de la matière sèche soluble du malt, des teneurs en azote total et en acides aminés libres (Dewar *et al.*, 1997). De même, une trempe alternée avec une période sous air de 3h donne des malts de meilleure qualité comparée à une aération de 1, 2 et 4h (Ezeogu et Okolo, 1995).

1.3.2 La germination

C'est l'étape la plus importante dans le maltage. Elle initie grâce aux amylases et protéases synthétisées, l'hydrolyse de l'amidon, des protéines en composés assimilables plus simples comme des sucres fermentescibles et des acides aminés. Elle permet la migration des enzymes protéolytiques et amylolytiques (β -amylase) initialement présents dans le germe et la couche à aleurone vers l'albumen où est stocké l'amidon. Les enzymes hydrolytiques en particulier l' α -amylase et les protéases sont synthétisés au cours de la germination sous l'influence de l'acide gibbérellique, une hormone qui induit la synthèse d'ARNm spécifiques et qui augmente aussi l'efficacité de la traduction de ces ARN (Muralikrishna et Nirmala, 2005). L'activité β -amylasique reste inchangée à un faible niveau comparativement à d'autres céréales ainsi pour le sorgho elle est inférieure de 25% à celle de l'orge maltée (Agu et Palmer, 1998). Lors du maltage du sorgho, la proportion entre le glucose et le maltose est 1,6 :1 (Ogu *et al.*, 2006). La germination du sorgho à 30°C augmente l'activité enzymatique mais occasionne beaucoup de pertes alors qu'à 20°C elles sont moindres. La diminution de la teneur en amidon est comprise entre 68% et 44% (w/w) pour les variétés de sorgho riche en tanin et de 75% à 55% (w/w) pour celles à faible tanin après 48h de germination (Elmaki *et al.*, 1999). En plus de la synthèse d'enzymes hydrolytiques, la germination s'accompagne de la réduction du taux de phytates, de certains flavonoïdes et de proanthocyanidines. La germination conduit aussi à l'augmentation de la disponibilité de certains minéraux (fer, zinc, etc.) et d'acides aminés essentiels (principalement Lys, Tyr et Met). La teneur en vitamine C qui était basse avant la germination est fortement augmentée. Alors que la germination a généralement des aspects positifs, il est important de noter qu'elle augmente les teneurs en composés cyanogénétiques qui seront éliminés lors des étapes de transformation ultérieures en particulier le séchage (Dicko *et al.*, 2006)

1.3.3 Le séchage

Le séchage permet d'arrêter la germination. Il facilite aussi le dégermage qui consiste à ôter les radicules sèches. Le séchage du sorgho malté est généralement réalisé à basse température. Il est réalisé à 50°C pendant 24 h (Dewar *et al.*, 1997) en veillant à ne pas trop allonger la durée de séchage car cela conduit à une perte importante d'activité enzymatique. Selon Agu et Palmer (1996), un séchage à 35, 40 et 45°C diminue le pouvoir diastasique respectivement de 7,7, 8,7 et 12,4% alors que Traoré *et al.*, (2004) ont constaté une réduction de 16% des activités amylasiques des malts séchés au soleil.

1.4 Les α -amylases

Les amylases appartiennent à la famille des hydrolases (qui représente 75% des enzymes) et plus précisément au groupe des glycosides hydrolases d'après Reddy *et al.* (2004) ; Michelin *et al.* (2010) ; Sharma et Satyanarayana (2013). Les glycosides hydrolases peuvent être classées en trois grands groupes en fonction des liaisons qu'elles hydrolysent, soit :

Groupe 1. Hydrolyse des liaisons α -1,4 de l'amylose et de l'amylopectine (les deux constituants de l'amidon) libérant ainsi des oligosaccharides et des dextrines. Dans ce groupe, nous retrouvons principalement l' α -amylase (EC 3.2.1.1).

Groupe 2. Les exoamylases regroupent la β -amylase (EC 3.2.1.2), l' α -glucosidase (EC 3.2.1.20) et la glucoamylase ou l'amyloglucosidase (EC 3.2.1.3). Leur action libère des sucres de faible poids moléculaire comme le glucose, le maltose et des oligosaccharides.

Groupe 3. Les enzymes de débranchement hydrolysent les liaisons α -1,6 de l'amylopectine. La pullulanase (EC 3.2.1.41) et l'isoamylase (EC 3.2.1.68) appartiennent à ce groupe.

L' α -amylase catalyse l'hydrolyse des liaisons α -1,4-glycosidiques de l'amidon en libérant des oligosaccharides linéaires et ramifiés en chaînes de différentes longueurs, ainsi que du glucose (Sharma et Satyanarayana, 2013; Xie *et al.*, 2014).

Les α -amylases sont aussi classées en fonction de leur produit final en α -amylases de saccharification et en α -amylases de liquéfaction. Les α -amylases de saccharification produisent des sucres libres, mais réduisent la viscosité des pâtes d'amidon lentement. Au contraire, les α -amylases liquéfiantes réduisent rapidement la viscosité des pâtes d'amidon sans produire de sucres libres.

Les α -amylases saccharifiantes, sont en outre classées comme formant du maltose, du maltotétraose, du maltopentose filmogène et du maltohexaose.

En fonction de leur pH optimal d'activité, les α -amylases sont également classées comme acides, neutres ou alcalines. La gamme de pH optimal des α -amylases va de pH 2 à pH 12. La plupart des α -amylases sont actives à pH 7 (Pandey *et al.*, 2000). Les α -amylases de souches de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Micro monospora melanospora* et *Geobacillus thermoleovorans* ont respectivement, une activité maximale à pH 6, 6,5, 7 et 8 (Najafi *et al.*, 2005). La température optimale pour les α -amylases se situe entre 45 et 120°C (Laderman *et al.*, 1993).

1.5 La fermentation lactique

C'est en 1857 que Louis Pasteur, publie un mémoire sur la fermentation lactique dans lequel il affirme le rôle joué par un ferment lactique (Pasteur, 1857a). En 1873, Lister sera le premier à mettre en évidence la présence de bactéries lactiques dans du lait (Lister, 1873).

1.5.1 Les bactéries lactiques

Le terme bactéries lactiques fait principalement référence à leur capacité à fermenter des hexoses pour donner principalement de l'acide lactique. Cette propriété peut être considérée comme le processus le plus important utilisé en technologie alimentaire (Kandler, 1983). La définition de bactérie lactique est biologique plutôt que taxonomique, c'est-à-dire que l'ensemble des bactéries lactiques ne constitue pas un groupe monophylétique de bactéries (Makarova et Koonin, 2007).

Le groupe des bactéries lactiques comprend des coques : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostocs* et *Atopobium*, et des bacilles : *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, (Hurtado *et al.*, 2012; Mazzoli *et al.*, 2014). L'appellation de bactéries lactique est souvent étendue aux bifidobactéries, qui sont des bacilles Gram⁺ présentant une extrémité bifide (Desmazeaud et Roissart, 1994; Ringø et Gatesoupe, 1998).

Les bactéries lactiques sont des coques ou des bacilles à coloration de Gram-positive qui sont immobiles, non sporulées, anaérobies mais aéro tolérantes. Elles sont dépourvues de catalase bien que certaines souches possèdent une pseudo-catalase, de nitrate réductase et de

cytochrome C oxydase. Elles ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux. Seules quelques espèces de ce groupe sont capables d'hydrolyser la caséine.

1.5.2 Le métabolisme énergétique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques diffèrent par leur mode de fermentation du glucose qui peut être homo ou hétérofermentaire (Halász, 2009; Gaspar *et al.*, 2013). Selon l'espèce et les conditions de culture, le catabolisme du glucose peut suivre trois voies différentes : homofermentaire stricte, homofermentaire facultative et hétérofermentaire stricte. C'est le cas des espèces du genre *Lactobacillus* divisé en trois groupes dont les caractéristiques respectives sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Propriétés des trois groupes du genre *Lactobacillus*
(Salminen et Von Wright, 2004)

Charateristic	Group I, Obligately homofermentative	Group II, Facultatively heterofermentative	Group III, Obligately heterofermentative
Pentose fermentation	-	+	-
CO2 from glucose	-	-	+
CO2 from gluconate	-	+ ^a	+ ^a
FDP aldolase present	+	+	-
Phosphoketolase present	-	+ ^b	+
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. Brevis</i>
	<i>Lb. delbrückii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. Buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. Fermentum</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. Reuteri</i>

^aWhen fermented

^bInducible by pentoses

1.5.2.1 La voie homofermentaire ou voie D'Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP)

La fermentation homolactique (figure 4) ne produit que de l'acide lactique via la voie homofermentaire chez les bactéries homofermentaires. Chez ces bactéries, une mole de glucose conduit par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) à la formation de deux moles de pyruvates, deux moles d'ATP et deux moles de NADH, H⁺. L'oxydation du NADH, H⁺ est couplée à la réduction du pyruvate en lactate. Le rendement de conversion du glucose est élevé, au moins 85% du glucose consommé est métabolisé en acide lactique selon la réaction bilan :



Chez les bactéries lactiques homofermentaires, le glucose est simultanément phosphorylé en glucose-6-phosphate pendant son transport par le PEP-PTS. Le groupe phosphate provient de la conversion du PEP en pyruvate. Ce système est très performant car il fonctionne sans l'établissement d'un gradient tant l'activité catabolique intracellulaire est intense (Postma *et al.*, 1993). Le glucose-6-phosphate est ensuite fermenté en acide lactique. La fructose-1,6-diphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) indispensable à la voie EMP est présente chez toutes les espèces homofermentaires (Thompson et Gentry-Weeks, 1994). Parmi les espèces homofermentaires, il est possible de citer des coques : *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus halophilus* et des bacilles, *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus plantarum* (Desmazeaud et Roissart, 1994).

Lors de la fermentation homofermentaire, l'acide pyruvique, est réduit soit en D-lactate ou en L-lactate ou en un mélange des deux isomères ce qui dépend de la souche lactique qui possède ou non les gènes codant pour la L-LDH et / ou la D-LDH (Mazzoli *et al.*, 2014). Les quantités relatives des deux stéréo-isomères peuvent dépendre aussi de la présence possible d'une lactate-racémase (EC 5.1.2.1) (Goffin *et al.*, 2005).

1.5.2.2 La voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphates (PPC)

La voie des pentoses phosphates (figure 6) est une autre voie du catabolisme du glucose qui conduit à la formation de moins de 1,8 moles d'acide lactique par mole de glucose consommée plus de l'éthanol, de l'acétate et du dioxyde de carbone. Les bactéries lactiques hétérofermentaires ne possèdent pas de fructose diphosphate aldolase (FDP aldolase) et de triose-phosphate isomérase.

Les bactéries hétérofermentaire ne possèdent pas de système PEP-PTS pour le transport du glucose. Le glucose accumulé par l'intermédiaire d'une perméase est directement phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par une glucokinase ATP-dépendante. Le G6P est ensuite oxydé en gluconate-6P puis une deuxième oxydation, catalysée par la D-gluconate-6P-NADP oxydoréductase conduit à la formation de D-ribulose-5-P qui est épimérisé en D-xylulose-5P et de dioxyde de carbone. La D-xylulose-5P phosphocétolase (EC. 4.1.2.9) qui est une enzyme spécifique de la voie hétérofermentaire catalyse la formation d'acétyl-P et de glycéraldéhyde-3P (GA-3P) à partir de D-xylulose-5P. L'acétyl-P est réduit en éthanol et le GA-3P est métabolisé par les enzymes de la voie EMP pour produire de l'acide lactique à partir du pyruvate. Les coques lactiques hétérofermentaires appartiennent au genre *Leuconostoc* comme *Leuconostoc mesenteroides* ou *Leuconostoc oenos*. Les principales espèces de lactobacilles hétérofermentaires sont : *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sanfranciscensis* et *Lactobacillus pontis*.

1.5.2.3 Voie des bifidobactéries ou voie de la F6P-phosphocétolase

Les bifidobactéries (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*) forment un groupe de bactéries Gram positive strictement anaérobies, non pathogènes et non sporulantes. Chez ces bacilles, le métabolisme du glucose produit 1 mole de lactate et 1,5 mole d'acétate, mais pas de CO₂ au cours de la fermentation. C'est en raison des proportions respectives de ces acides organiques, de l'absence de l'aldolase et du faible taux de phosphofructokinase, que cette voie a été considérée comme indépendante des voies homo et hétérofermentaires. L'enzyme clef de cette voie est la fructose 6- phosphocétolase. Cette voie produit un bilan net de 2,5 moles d'ATP par mole de glucose (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

1.5.3 Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques

Carbone :

Les bactéries lactiques sont hétérotrophes chimio-organotrophes capables de fermenter des pentoses (ribose, arabinose, xylose, etc.), des hexoses (glucose, fructose, etc.), des disaccharides (lactose, saccharose, maltose). Certaines espèces sont capables de métaboliser des molécules aux propriétés antinutritionnelles comme les α -galactosides, à savoir le raffinose, le stachyose, et les phytates.

Azote

Les bactéries lactiques sont incapables de croître dans un milieu où la seule source d'azote est l'ammoniacque (Corrieu et Luquet, 2008). Elles sont auxotrophes pour de nombreux acides aminés. Elles ne peuvent assimiler que des acides aminés libres ou des petits peptides, cependant les sources d'acides aminés peuvent être complexes comme les extraits de viandes ou de levure, les peptones ou les tryptones de viande ou de soja, hydrolysés par des protéases et des peptidases microbiennes (Desmazeaud et Roissart, 1994).

Vitamines

Les bactéries lactiques sont auxotrophes pour de nombreuses vitamines avec des exigences différentes d'une souche à l'autre même au sein de la même espèce. L'ensemble des bactéries lactiques ont des exigences pour les vitamines du groupe B comme la niacine, la riboflavine et l'acide pantothénique (Corrieu et Luquet, 2008).

Bases azotées

Plusieurs études mentionnent des exigences en bases azotées, sans doute liées à l'absence d'enzymes impliqués dans la biosynthèse des pyrimidines et des purines. L'ajout de bases azotées serait stimulant pour la croissance des bactéries lactiques (Ledesma *et al.*, 1997).

Sels minéraux

La présence de magnésium est indispensable dans les milieux de culture car ce cation divalent est le cofacteur de nombreuses réactions enzymatique et assure aussi la stabilisation des acides nucléiques. Le manganèse est indispensable à la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* et des lactobacilles car il est le cofacteur de réactions enzymatique et chez certaines souches, il assure une meilleure tolérance à l'oxygène par élimination de l'ion superoxyde. La présence de potassium en concentration élevée est nécessaire pour la synthèse des protéines et le maintien du pH intracellulaire. La présence de fer n'est pas indispensable pas plus que celle du calcium (Corrieu et Luquet, 2008).

1.5.4 Influence des facteurs environnementaux sur la croissance des bactéries lactiques

Effet de la température

Les bactéries lactiques sont, soit mésophiles, soit thermophiles, selon que leur température optimale de croissance est proche de 30°C ou de 40°C. Le tableau 3 renseigne sur les températures minimale, optimale et maximale de croissance des principaux genres de bactéries lactiques. En dessous de la température minimale et au-dessus de la température maximale, la croissance est nulle. L'inactivation thermique des bactéries lactiques intervient à des températures supérieures, ainsi l'inactivation thermique de souches de *Lactobacillus plantarum* peut intervenir dès 55°C (Aryani *et al.*, 2016). Ces valeurs sont indicatives car il existe une grande diversité qui peut être inter et intra spécifique. Ainsi le genre *Lactobacillus* comprend à la fois des mésophiles et des thermophiles.

Tableau 3: Températures de croissance des bactéries lactiques.

Genre	Température minimale (*)	Température optimale (*)	Température maximale (*)
<i>Carnobacterium</i>	0°C	22-30°C	≤ 40°C
<i>Leuconostoc</i>	≤ 5°C	18-30°C	< 40°C
<i>Vagococcus</i>	≤ 5°C	25-30°C	≤ 40°C
<i>Lactococcus</i>	≤ 10°C	27-32°C	≤ 40°C
<i>Pediococcus</i>	≤ 15°C	25-40°C	≤ 45°C
<i>Lactobacillus (mésophiles)</i>	≤ 15°C	30-35°C	≤ 45°C
<i>Streptococcus (thermophiles)</i>	20°C	42-43°C	< 50°C
<i>Lactobacillus (thermophiles)</i>	≤ 30°C	40-45°C	≤ 52°C

(*) A l'intérieur de chaque genre ces températures peuvent varier d'une espèce à l'autre (Desmazeaud et Roissart, 1994).

Effet du pH et de l'acide lactique

Le pH du milieu de culture comme pour toutes les bactéries, influence fortement la croissance des bactéries lactiques. Il agit sur la solubilité des composants nutritifs et sur la perméabilité de la membrane cellulaire, mais aussi sur l'activité des enzymes produits et excrétés par les bactéries ou des enzymes endogènes libérés après la lyse bactérienne et qui participent à l'élaboration de la qualité de l'aliment fermenté.

Des valeurs du pH optimal de croissance et celles du pH final d'acidifications relevées dans la littérature sont données dans le tableau 4 (Desmazeaud et Roissart, 1994). Les *Lactobacillus* en particulier les souches de *Lactobacillus plantarum*, sont considérées comme acidophiles et acido tolérantes ce qui explique pourquoi elles sont majoritaires à la fin de la fermentation.

Tableau 4 : Valeurs du pH optimal de croissance et du pH final d'acidification de bactéries lactiques

Genres	pH optimal	pH final
<i>Lactobacillus</i>	5,5-6,2	3,2-3,5
<i>Pediococcus</i>	5,5-6,5	3,5-4,4
<i>Lactococcus</i>	6,3-6,5	4,0-4,5
<i>Leuconostoc</i>	6,3-6,5	5
<i>Enterococcus</i>	7,0	4,2-4,5

Au cours de la fermentation, la production d'acide lactique entraîne une baisse du pH, quand sa valeur avoisine celle du pKa de l'acide lactique (3,86), celui-ci est majoritairement sous forme non dissocié. Sous cette forme, il pénètre dans la bactérie où la valeur du pH du hyaloplasme est plus élevée, ce qui entraîne sa dissociation qui conduit à un abaissement du pH intracellulaire et à la diminution de l'activité métabolique de la bactérie (Corrieu et Luquet, 2008). Une concentration intracellulaire en acide lactique suffisamment importante peut conduire à l'arrêt total de la croissance. L'inhibition de la fermentation lactique par le pH et la production d'acide lactique intervient pour des valeurs de pH et de concentration en acide lactique non dissocié variables selon le genre bactérien considéré mais aussi pour des souches appartenant à la même espèce.

Peu de données relatives aux valeurs du pH maximal de croissance des bactéries lactiques sont disponibles. Cependant les quelques études réalisées indiquent une valeur de pH maximale limite comprise entre 9 et 9,5. La figure 7 présente des valeurs de pH maximal des principales espèces de *Lactobacillus* et d'une souche d'*Enterococcus hirae*, selon Sawatari et Yokota (2007). Les bactéries lactiques capables de croître dans cette gamme de pH ou au-delà sont qualifiées d'alcalino-tolérantes ou d'alcalinophiles,

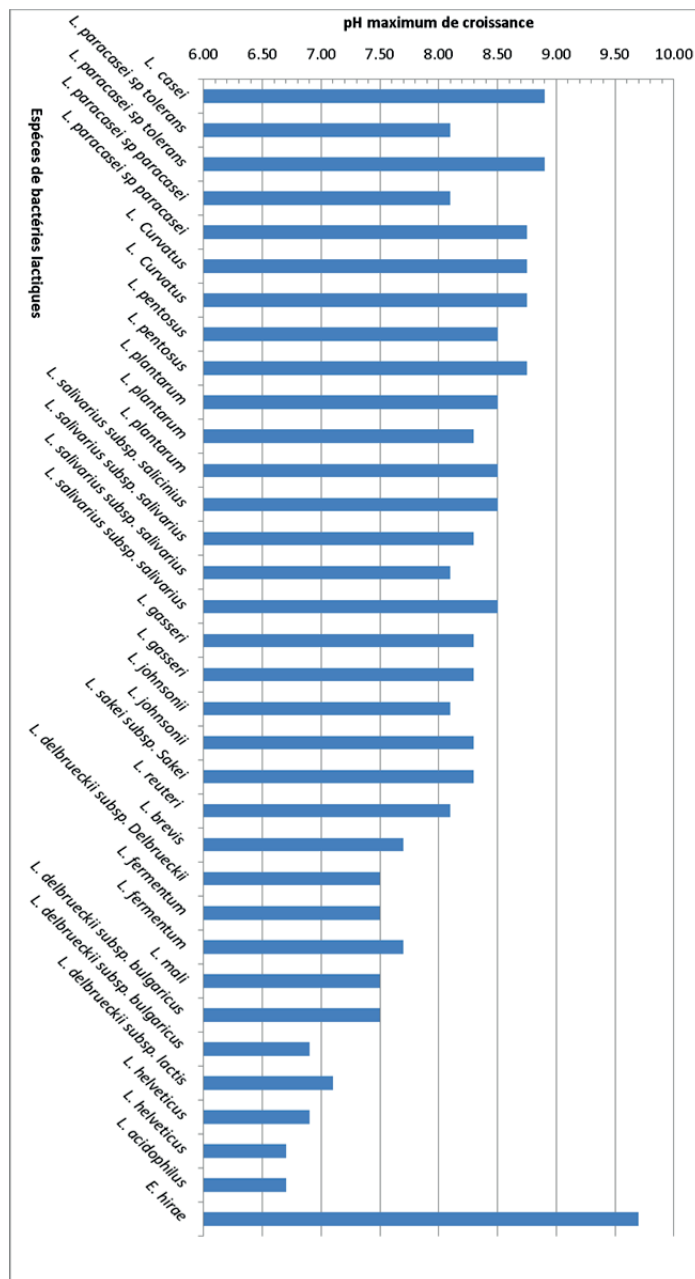


Figure 7 : Valeurs de pH maximal de croissance de Lactobacillus et d'une souche d'Enterococcus hirae.

Effet de l'oxygène

La plupart des bactéries lactiques à l'exception de certaines espèces et dans certaines conditions sont incapables de respirer. Elles produisent leur énergie par fermentation homo ou hétérofermentaire à partir de glucides. Cependant les bactéries lactiques en tolèrent la présence en quantité plus ou moins importante (Corrieu et Luquet, 2008) ce qui a conduit à distinguer des souches anaérobies facultatives, microaérophiles et aérotoérantes, bien que cette qualification ne soit pas parfaite car selon le substrat consommé et les conditions de

culture une souche peut se comporter comme étant anaérobie facultative, microaérophiles ou aérotole'ante. Certaines souches sont capables de consommer de l'oxygène présent dans le milieu de culture à condition que celui-ci contienne un substrat oxydable (Desmazeaud et Roissart, 1994). Dans ces conditions, la consommation d'oxygène conduit à la production de peroxyde d'hydrogène et de radicaux libres d'oxygène qui ralentissent, voire inhibent la croissance des bactéries en endommageant certains enzymes, certains lipides membranaires et l'ADN (Corrieu et Luquet, 2008). Les principaux enzymes impliqués dans cette production sont la pyridine-nucléotide oxydase présente chez toutes les bactéries lactiques, la pyruvate oxydase et l' α -glycérophosphate-oxydase. La dismutation du superoxyde d'oxygène (O_2^-) serait aussi une source importante d' H_2O_2 . La capacité des bactéries lactiques à éliminer le peroxyde d'hydrogène formé en aérobiose est la base de leur aérotole'ance. Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase mais disposent de différents moyens de défense vis-à-vis de ce toxique. Le mécanisme rencontré chez la plupart des bactéries lactiques est la production d'une peroxydase flavinique utilisant le NADH, H^+ (lactocoques, entérocoques, lactobacilles). Certaines bactéries produisent une superoxyde dismutase à Mn^{2+} qui permet d'éliminer les radicaux libres d'oxygène (lactocoques et entérocoques). Certaines bactéries lactiques utilisent une pseudo catalase non hémique mais à Mn^{2+} . Enfin certaines espèces comme *Lactobacillus plantarum*, peuvent accumuler des ions Mn^{2+} dont l'oxydation s'accompagne de la disparition des radicaux libres d'oxygène (Desmazeaud et Roissart, 1994).

La capacité de certaines bactéries lactiques, comme *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecalis*, à respirer a été mise en évidence, elle conduit à l'augmentation de la croissance et de la viabilité de souches lactiques quand on leur fournit de l'hème ou des ménaquinones comme la vitamine K2. Quatre mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer les bénéfices de la respiration chez les bactéries lactiques capables de respirer dans ces conditions : (i) le rendement énergétique de la respiration est plus élevé que celui de la fermentation ; (ii) la respiration génère moins de stress acide, le NADH, H^+ est régénéré en NAD^+ par les réactions de la chaîne respiratoire au détriment de la lactate déshydrogénase qui utilise le NADH, H^+ pour produire de l'acide lactique ; (iii) la respiration diminue le stress oxydatif car l'oxygène est réduit en eau ce qui diminue sa teneur intracellulaire ; (iv) la respiration contribue à la diminution des radicaux libres (Lechardeur *et al.*, 2011).

La respiration conduit à la production d'acide acétique, de dioxyde de carbone et d'acétoïne à partir du glucose avec un faible niveau de production d'acide lactique (Corrieu et Luquet,

2008). La croissance aérobie permet à certaines bactéries lactiques de métaboliser le glycérol, le mannitol, le sorbitol, et le lactate ce qu'elles ne pouvaient pas faire en absence d'oxygène (Desmazeud et Roissart, 1994).

L'activité de l'eau

L'impact de la teneur en eau du milieu sur la croissance des bactéries lactiques est important car il détermine la capacité des souches lactiques à fermenter des matières premières qui ont parfois des valeurs d' a_w faibles d'autant plus que la valeur de l' a_w des matières premières peut avoir diminuée lors des traitements réalisés avant la fermentation comme le séchage ou le salage. Le salage étant pour une grande part des aliments lactofermentés comme le saucisson, la choucroute, etc. une étape essentielle pour le bon démarrage de la fermentation lactique. Troller et Stinson (1981) ont déterminé une valeur limite d' a_w de 0,95 pour des souches de *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* et de *Lactobacillus plantarum* avec comme dépréciateur d' a_w du glycérol ou du saccharose. Le tableau 5 présente les valeurs maximales de concentration en NaCl de 25 souches de bactéries lactiques isolées de lait de dromadaire (Khedid *et al.*, 2009). Globalement, les souches étudiées sont capables de se multiplier quand le taux de NaCl est de 2% (w/v) et pour certaines jusqu'à 6,5%. Cette propriété constitue un avantage qui permet aux bactéries lactiques de devenir majoritaires au début de fermentation lactique de produits végétaux ou animaux au détriment des flores d'altération et/ou pathogènes inhibées par les teneurs en NaCl atteintes après le salage. C'est particulièrement vrai pour les souches de *Leuconostoc* qui supportent des concentrations élevées en sel, ce qui explique que ces souches initient la majorité des fermentations lactiques (Oyewole et Isah, 2012).

Tableau 5 : Teneur de NaCl maximale de croissance de souches de bactéries lactiques isolées de lait de dromadaire.

Souche	Teneurs en NaCl % (w/v)				
	2	3	4	6.5	10
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>			■		
<i>Lactococcus gravia</i>			■		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>	■				
<i>Lactococcus lactis</i> biovar <i>diacetylatis</i>			■		
<i>Lactococcus. Raffinolactis</i>		■			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Mesenteriodes</i>					
<i>Leuconostoc lactis</i>					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Cremoris</i>		■			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Dextranicum</i>		■			
<i>Enterococcus casseliflavus</i>					
<i>Enterococcus faecalis</i>				■	
<i>Streptococcus salivaris</i> subsp. <i>Thermophilus</i>				■	
<i>Pediococcus acidilatici</i>				■	
<i>Pediococcus damnosus</i>					
<i>Pediococcus pentosaceus</i>				■	
<i>Lactobacillus helveticus</i>			■		
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Casei</i>			■		
<i>Lactobacillus plantarum</i>			■		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i>	■				
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Delbrueckii</i>	■				
<i>Lactobacillus brevis</i>	■				
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>Tolerans</i>	■				
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>					
<i>Lactobacillus amylophilus</i>			■		
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Rhamnosus</i>			■		

1.6 La fermentation alcoolique

1.6.1 Historique

La présence d'éthanol qui caractérise certaines boissons fermentées résulte du métabolisme de levures qui convertissent les glucides présents dans les fruits, les céréales, le miel, et d'autres sources de carbone en éthanol (Varela, 2016).

Bien que la fermentation alcoolique soit utilisée depuis des millénaires pour fabriquer des boissons fermentées et des aliments tels que le vin, le cidre, la bière, le pain et les produits laitiers ce n'est qu'à partir de 1789 que Lavoisier décrit la «fermentation vineuse» comme une

division du sucre en deux portions (alcool et acide carbonique), division réalisée par un «ferment» (Lavoisier, 1789). Gay-Lussac, en 1810, définit ensuite l'équation chimique de la réaction globale (Gay-Lussac, 1810), à savoir :



En 1837, (Cagniard de la Tour, 1837) en France, (Kutzing, 1837; Schwann, 1837) en Allemagne publièrent séparément leurs observations microscopiques qui leur permettaient de conclure que la levure était un micro-organisme vivant qui se reproduisait par bourgeonnement, nommé par Schwann "champignon du sucre" ou «Zuckerpilz » (qui donnera sous sa forme latine *saccharomyces*) pour lequel la fermentation du sucre était la source de matériel nécessaire à sa croissance et à sa nutrition. Louis Pasteur en 1857 établit définitivement que la fermentation alcoolique est due à l'activité métabolique de la levure de bière (Pasteur, 1857b).

1.6.2 Les levures et la fermentation alcoolique

1.6.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

A l'origine, les boissons fermentées résultaient de fermentations spontanées conduites par une microflore sauvage présente à la surface de la matière première utilisée mais aussi à l'intérieur des récipients utilisés. Que ce soit en brasserie, en œnologie, en cidrerie et en panification, la fermentation alcoolique est conduite par des souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et donc les premiers starters sélectionnés et utilisés dans ces filières, ont été des souches de cette espèce. Les travaux de sélection de souches de *Saccharomyces cerevisiae* se sont poursuivis et il est désormais possible de disposer de centaines de starters commerciaux adaptés à la production d'aliments fermentés particuliers, facilement utilisables. En œnologie sont disponibles des souches de levures sélectionnées plus adaptées à la vinification en rouge et d'autres à la vinification en blanc en relation avec des terroirs particuliers.

Dans la classification, les levures du genre *Saccharomyces* appartiennent à la famille des *Saccharomycetaceae* de l'ordre des *Saccharomycetales* dans la sous division des *Saccharomycotina* de la division *Ascomycota* du règne des mycètes ou *Fungi*. Le genre *Saccharomyces* est divisé en deux grands groupes, soit les *sensu stricto*, soit les *sensu lato*. Parmi les *sensu stricto*, figurent *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus* et *Saccharomyces pastorianus* (Masneuf *et al.*, 1998). Le groupe des *sensu lato* comprend *Saccharomyces castellii*, *Saccharomyces dairenensis*,

Saccharomyces servazzii, *Saccharomyces unisporus* et *Saccharomyces kluyveri* (Barnett, 1992; Nardi *et al.*, 2006).

1.6.2.2 *Pichia kluyveri*

Cette espèce appartient au genre *Pichia* de la famille des *Pichiaceae* de l'ordre des *Saccharomycetales* dans la sous division des *Saccharomycotina* de la division *Ascomycota* du règne des mycètes. Initialement, l'appartenance au genre *Pichia* était basée sur le phénotype des souches, à savoir : le bourgeonnement multilatéral sur une base étroite, la présence ou l'absence d'hyphes et de pseudohyphes, la forme de chapeau des ascospores pouvant être hémisphéroïdales, sphériques avec ou sans rebord, la capacité à fermenter des sucres (le glucose mais ni le maltose et le maltotriose) et l'assimilation du nitrate comme seule source d'azote. Cette définition, conduisait à classer 100 espèces de levures dans ce genre ce qui représentait alors environ 20% des levures connues. La comparaison de la séquence des gènes de l'ARN ribosomal a permis de préciser la classification de 14 espèces du genre *Pichia* dont : *Pichia kluyveri* var. *eremophila*, *Pichia kluyveri* var. *cephalocereana* et *Pichia kluyveri* var. *kluyveri* (Kurtzman et Cletus, 2011).

La présence de souches de l'espèce *Pichia kluyveri* a été mise en évidence dans la microflore de nombreux aliments, dont : le vin (Couto *et al.*, 2005), les fèves de cacao (Jespersen *et al.*, 2005), les fèves de café (Masoud *et al.*, 2004), des olives (Hurtado *et al.*, 2008), la bière de sorgho (N'guessan *et al.*, 2011), l'aguardiente (Morais *et al.*, 1997), dans le champus, une boisson fermentée à base de maïs (Osorio-Cadavid *et al.*, 2008). Anfang *et al.*, en (2009), ont isolé en Nouvelle Zélande, une souche de *Pichia kluyveri* de jus de raisin et de vin, capable de produire en co-culture avec *Saccharomyces cerevisiae* des teneurs élevées de 3-mercaptophexan-1-ol et de 3-mercaptophexyl acétate caractéristiques de l'arôme du Sauvignon Blanc. En 2013, Crafac *et al.*, ont montré que l'utilisation d'une souche de *Pichia kluyveri* commercialisée par la société Chr. Hansen A/S (Hørsholm, Danemark) lors de la fermentation de fèves de cacao impactait positivement la qualité aromatique du chocolat produit (Crafac *et al.*, 2013). Un brevet revendique l'utilisation de souche de *Pichia Kluyveri* pour la fabrication de bière à faible teneur en éthanol ou sans alcool (Saerens et Swiegers, 2017).

1.6.3 Métabolisme énergétique des levures

Selon le type de leur métabolisme énergétique lié à la consommation de glucose, les levures peuvent être classées en non fermentatives, facultativement fermentatives et obligatoirement fermentatives. Les levures non fermentatives ont exclusivement un métabolisme respiratoire

et sont incapables de réaliser la fermentation alcoolique à partir de glucose tandis que les levures obligatoirement fermentatives sont seulement capables de métaboliser le glucose lors de la fermentation alcoolique. La plupart des levures sont facultativement fermentatives. Chez les levures facultativement fermentatives, ce sont le type et la concentration de sucres et / ou la disponibilité de l'oxygène, qui déterminent le métabolisme qui peut être totalement respiratoire ou fermentatif, soit mixte respiratoire/fermentatif ce qui est le cas pour *Saccharomyces cerevisiae* (Rodrigues *et al.*, 2006).

La principale source de production d'énergie chez les levures est l'oxydation des glucides en particulier le glucose. La première étape est l'oxydation du glucose en pyruvate lors de la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas) dans le cytoplasme des levures. Les produits de la glycolyse sont de 2 molécules d'ATP, 2 molécules de pyruvate, 2 molécules de NADH, H⁺ et 2 molécules d'eau par molécule de glucose consommée (figure 8).

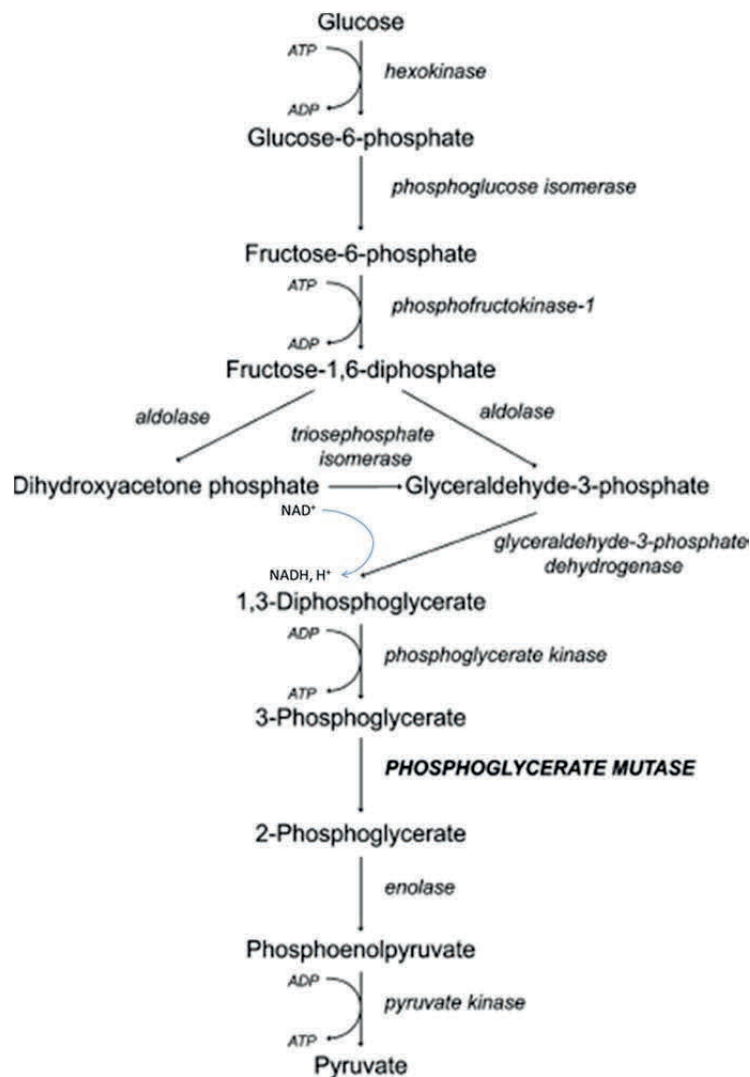
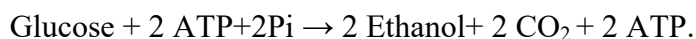


Figure 8 : Schéma de la glycolyse.

En anaérobiose, l'oxygène absent ne peut pas être l'accepteur final d'électrons. Dans ces conditions la régénération des NADH, H⁺ en NAD⁺ est impossible via la chaîne de transport des électrons. Dans ces conditions le pyruvate s'accumule dans la cellule. Il est alors décarboxylé en acétaldéhyde qui est réduit en éthanol par l'alcool déshydrogénase en présence de NADH, H⁺ qui est réoxydé en NAD⁺.

Le bilan de la fermentation alcoolique est :



Chez *Saccharomyces cerevisiae* une partie (4% environ) du glucose consommé lors de la fermentation alcoolique conduit à la formation de glycérol par réduction de la dihydroxyacétone phosphate pour donner des teneurs finales en glycérol proches de 5 à 7g.L⁻¹ (Scanes *et al.*, 1998). Le rendement massique théorique de production d'éthanol lors de la fermentation est de 0,511 g d'éthanol par gramme de glucose consommé. Ce rendement n'est jamais atteint car une partie du glucose est utilisée pour la synthèse de biomasse et de métabolites secondaires comme le glycérol. Chez *Saccharomyces cerevisiae* en conditions œnologiques, les rendements observés sont entre 0,47 et 0,48g/g d'alcool par gramme de glucose ce qui est proche de la valeur observée de 17g.L⁻¹ de glucose consommé pour donner 1 degré d'alcool. Dans ces conditions le rendement en biomasse est de 0,05 à 0,11g/g (Lonvaud *et al.*, 2010) et la vitesse de croissance peut atteindre 0,35h⁻¹ (Fraleigh *et al.*, 1989).

En aérobiose, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène, le pyruvate est oxydé en acétyl-coenzyme A et en CO₂. L'étape suivante est l'oxydation complète de l'acétyl-coenzyme A en CO₂ dans le cycle de Krebs couplée à la réduction des coenzymes FAD et NAD⁺. Le bilan du cycle de Krebs dans la mitochondrie, est :



Le complexe NADH déshydrogénase (ou complexe respiratoire mitochondrial I) catalyse l'oxydation de NADH, H⁺ par l'ubiquinone couplée au transfert de protons à travers la membrane mitochondriale. Le complexe I existe dans la plupart des organismes vivants et certaines des protéines qui le constituent sont codées par des gènes (gènes ND) portés par le génome mitochondrial. Pour certaines espèces de levures, comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* l'absence des gènes ND a été rapportée et le site 1 de la phosphorylation est absent (Nosek et Fukuhara, 1994). L'absence du complexe I fait que l'oxydation d'une mole de NADH, H⁺ est couplée à la phosphorylation de 2 moles d'ADP au

lieu de trois chez la majorité des autres organismes. Dans ces conditions, la consommation d'une mole de glucose en aérobiose peut fournir à la cellule un maximum de 26 moles d'ATP, soit treize fois plus que la fermentation alcoolique (Bakker *et al.*, 2001). Lors de la respiration, la levure consomme 70 à 75% du sucre total pour produire de l'ATP. Le reste est consommé pour la biosynthèse (20%) et le maintien du potentiel redox (5 à 10%) (Boitard, 2010). A des faibles concentrations en glucose et en milieu aéré et agité, le rendement de conversion du glucose en biomasse peut aller jusqu'à 0,5g/g pour une vitesse maximale de croissance de 0,3h⁻¹ (Riba, 1998).

Les souches de *Pichia kluyveri* ne sont pas aussi performantes en fermentation alcoolique que celles de *Saccharomyces cerevisiae*. Un rendement de conversion des sucres en éthanol de 0,36g/g et une capacité à fermenter 48% des sucres d'un mélange de glucose et fructose (1/1) initialement présents à 150g/l dans un milieu semi synthétique ont été mesurés (Contreras *et al.*, 2015).

1.6.4 Régulation du métabolisme carboné

Chez certaines espèces comme *Saccharomyces cerevisiae*, la concentration en glucose et la présence ou non d'oxygène jouent un rôle important sur les mécanismes de régulation du métabolisme énergétique, à savoir : l'effet Pasteur, l'effet Crabtree, l'effet Custer et l'effet Kluyver.

Effet Pasteur

Saccharomyces cerevisiae comme d'autres levures peut métaboliser du glucose en présence ou en absence d'oxygène. En 1861, L. Pasteur a observé que la levure de bière consommait beaucoup plus de glucose en anaérobiose. En résumé, l'aérobiose, diminue la consommation du sucre et inhibe la fermentation. Cette inhibition de la fermentation par la respiration est appelé l'effet Pasteur. Cette inhibition est expliquée par la compétition entre l'activité de la pyruvate déshydrogénase (respiration) et l'activité de la pyruvate décarboxylase (fermentation) qui a une affinité plus faible pour le pyruvate. En aérobiose, le flux de glucose est ralenti ce qui conduit à une baisse de la concentration en pyruvate, cette baisse induit un ralentissement de l'activité de la pyruvate décarboxylase (Lagunas, 1986). L'effet Pasteur est plus important chez les espèces qui ont un métabolisme respiratoire important caractérisé par une faible consommation de glucose et une forte consommation d'oxygène comme *Candida tropicalis*. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, cet effet est de faible amplitude et c'est la

concentration en glucose qui inhibe la respiration à des niveaux de concentration en glucose très bas (effet Crabtree).

Effet Crabtree

L'effet Crabtree est la capacité de certaines espèces de levure, en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, à fermenter le glucose en présence d'oxygène même quand sa concentration est élevée. Pour *Saccharomyces cerevisiae* cultivée en batch, cet effet est observé quand la concentration en glucose dépasse 0,15 gL⁻¹. Pour certains auteurs, cette propriété serait apparue au cours des temps et permettrait aux levures Crabtree positives de se maintenir dans des milieux riches en sucres au détriment d'autres micro-organismes sensibles à des teneurs élevées en éthanol en « gaspillant les sucres » (Pfeiffer et Morley, 2014). Une autre explication serait que cet effet permettrait de limiter la synthèse de peroxydes oxygènes responsables d'altérations des fonctions cellulaires, en particulier pour minimiser les risques de mutations lors de la réplication de l'ADN (Broach, 2012). D'un point de vue métabolique, l'activité spécifique des enzymes du cycle de Krebs diminue fortement de 60 à 89% quand la concentration en glucose augmente de 0,8% à 10% (Wales *et al.*, 1980). Les mécanismes permettant à la levure de réagir aux fluctuations de la concentration en glucose restent à élucider cependant l'existence de systèmes de perception des teneurs en sucres capables d'induire l'inhibition de la respiration au travers de la synthèse d'AMP cyclique semble être largement acceptée (Rolland *et al.*, 2002).

Effet Custer

L'effet Custer est observé chez les levures appartenant aux genres *Brettanomyces* et *Dekkera* chez qui on observe en anaérobiose, une inhibition de la fermentation du glucose en éthanol et en acide acétique. Cette inhibition peut être entièrement levée par la réintroduction de l'oxygène dans le milieu de culture ou par l'addition d'accepteurs d'électrons comme l'acétoïne (réduite en 2,3-butanediol), ou d'autres composés carbonyles aliphatiques (Rodrigues *et al.*, 2006). L'effet Custer est le résultat de la formation excessive de NADH,H⁺ due à la formation d'acide acétique qui provoque un déséquilibre rédox (NAD⁺/NADH,H⁺) et de l'incapacité à produire du glycérol en réoxydant le NADH,H⁺. En présence d'oxygène, ces levures peuvent plus facilement réoxyder le NADH,H⁺ sur la chaîne des cytochromes et augmenter le flux glycolytique. *Saccharomyces cerevisiae* ne présente pas d'effet Custer.

Effet Kluyver

Cet effet a été défini quand l'étude de certaines levures a montré qu'elles pouvaient assimiler certains monosaccharides, disaccharides et oligosaccharides (galactose, maltose, raffinose, lactose, saccharose, cellobiose, etc.) en aérobiose, mais pas en anaérobiose. L'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, est caractérisée par un métabolisme presque exclusivement fermentaire et un effet Kluyver négatif pour la plupart des oses. L'effet Kluyver est associé à des combinaisons spécifiques d'espèces de levure et de sucres. Par exemple, l'espèce *Debaryomyces robertsiae* est effet Kluyver positif avec le galactose et négatif avec le maltose alors que c'est le contraire pour *Candida kruisli* et *Pichia heimii*. (Weusthuis *et al.*, 1994). Bien que plus de 100 espèces de levures aient été répertoriées comme étant Kluyver effet positives, les causes de cet effet ne sont pas bien explicitées à ce jour. Parmi les hypothèses proposées, il faut citer celle selon laquelle l'activité des transporteurs des différents glucides pourrait être différente d'une espèce à l'autre voire entre souches de la même espèce. L'activité des transporteurs serait modulée en fonction de l'état de la balance redox des cellules qui est influencée par la présence ou non d'oxygène (Fukuhara, 2003). Des études ont montré que *Kluyveromyces lactis* est capable de croître en utilisant du raffinose en l'absence de respiration en augmentant l'expression de son transporteur. Ces observations indiquent que l'orientation du métabolisme entre les voies respiratoires et fermentatives dépendrait moins du type de substrat que de la vitesse à laquelle ce substrat est importé (Huberts *et al.*, 2012).

1.6.5 Besoins nutritifs des levures en fermentation alcoolique

Les levures sont hétérotrophes, chimio-organotrophes sans grandes exigences nutritionnelles. Le niveau des besoins en macronutriments (C ; O ; N ; P ; S ; K et Mg) est de l'ordre de la millimole voire de la micromole pour les éléments traces et certains facteurs de croissance (Walker, 1998). Le métabolisme carboné est source d'énergie et de pouvoir réducteur. Il demeure la principale source de biomasse. Le carbone, l'oxygène et l'hydrogène des substrats carbonés contribuent à environ 75% du poids sec de la cellule. Le reste de l'apport nutritif nécessaire à la croissance cellulaire doit couvrir des besoins en azote, en soufre, en phosphore, en oligoéléments et en vitamines.

Azote

En œnologie, l'azote est après les sucres, l'élément indispensable pour assurer une bonne fermentation alcoolique, c'est-à-dire l'épuisement complet des sucres et la synthèse de composés aromatiques (Bely *et al.*, 1990). L'azote pouvant être utilisé par la levure durant la

fermentation alcoolique est dénommé « azote assimilable », il est constitué d'azote minéral, d'acides aminés et de peptides de petite taille ainsi l'ammonium et l'urée sont souvent utilisés comme source d'azote. L'espèce *Saccharomyces cerevisiae* est caractérisée par une répression catabolique azotée qui favorise les meilleures sources d'azote. Ainsi, en anaérobiose, le rendement en ATP est meilleur et la quantité de glycérol synthétisée est inférieure dans le cas de cultures supplémentées en acides aminés que lorsqu'elles le sont en ions ammonium (Boiardo, 2010). Dans la vacuole qui joue un rôle central dans le stockage des réserves métaboliques non-carbonées, l'azote cellulaire est recyclé par protéolyse.

Des études réalisées avec des souches de *Saccharomyces cerevisiae* en milieu à forte teneur en sucre (composition du milieu proche du moût de raisins), avec comme source d'azote de l'ammonium, ont permis d'établir que les besoins variaient de 120 à 290 mg.L⁻¹ d'azote assimilable. La quantité d'azote initialement assimilable ayant un impact plus marqué sur la vitesse d'assimilation des sucres que sur la vitesse de croissance. Trois types d'effet sur les taux de consommation de sucre ont été observés : (i) existence d'un niveau d'azote initial optimal pour un taux maximal de consommation de sucre conduisant à une inhibition en cas d'excès, (ii) absence d'effet de l'azote au-delà d'un niveau intermédiaire (saturation) et (iii) taux de consommation de sucre proportionnel au niveau initial d'azote (activation). L'exigence optimale varierait de 0,62 à 0,91 mg N/g de sucres selon les souches (Taillandier *et al.*, 2007).

Oxygène

L'oxygène moléculaire sert principalement d'accepteur d'électrons final pendant la respiration du glucose, mais il est également nécessaire dans plusieurs voies de biosynthèse, telles que celles de l'hème des stérols, des acides gras insaturés, des pyrimidines et de désoxyribonucléotides (Estela-Escalante *et al.*, 2012). L'apport d'oxygène moléculaire à de faibles niveaux (7 à 10 mg.L⁻¹) lors de la fermentation alcoolique, qui permet la synthèse de stérols constituants de la membrane cellulaire, renforce la viabilité des souches de levures et leur résistance à l'éthanol (Thomas *et al.*, 1978).

Vitamines

Beaucoup de vitamines ne sont pas synthétisées par les levures. Les besoins particuliers en vitamines des levures sont : la biotine, l'acide nicotinique, les vitamines B1 et B6 et l'acide pantothénique. La biotine est la vitamine la plus importante pour leur croissance. Cette vitamine est impliquée dans presque toutes les réactions enzymatiques qui créent les

constituants cellulaires (protéines, ADN, glucides, acides gras). Une carence en biotine ralentit la croissance et cause des arrêts de fermentations. Les apports de biotine doivent être de l'ordre de 60 à 100 µg/g de matière sèche de biomasse.

Phosphore

Le phosphore est un composant essentiel de l'acide désoxyribonucléique (ADN), ainsi que des phospholipides des membranes cellulaires. Le phosphore représente 3 à 5% du poids de matière sèche de la levure. La majeure partie est stockée dans les vacuoles à l'intérieur de la cellule. Une carence en phosphate lors de la fermentation conduit, en raison d'altérations de la réplication de l'ADN, à des arrêts de fermentations ou à des fermentations incomplètes. L'apport de phosphate est le plus souvent couplé à celui d'azote lors de la supplémentation en phosphate diammonique. Certains auteurs préconisent de relier la teneur de phosphore sous forme P_2O_5 à celle d'azote assimilable, soit une part de phosphore pour trois d'azote (Reed, 2012).

Les autres minéraux

Les minéraux sont utilisés comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et sont aussi des matériaux cellulaires. Le calcium est important pour la floculation de la levure, aussi des sels de calcium sont parfois ajoutés aux fermentations pour améliorer la floculation des cellules en brasserie pour accélérer la clarification de la bière par décantation. Le potassium a de nombreuses fonctions dans la cellule et peut représenter jusqu'à 2% du poids de matière sèche de la biomasse (très élevé pour un minéral, la plupart sont inférieurs à 0,1%). En absence de magnésium, la levure ne peut pas croître. Son rôle le plus important est d'être directement impliqué dans la synthèse de l'ATP. Il joue également un rôle dans la prévention de la mort cellulaire lorsque la concentration de l'éthanol s'accumule dans la cellule. Il a également été démontré qu'il améliorerait la capacité des cellules à résister au stress. Le zinc est un minéral qui est souvent limité dans le moût en brasserie. Sa teneur dans le milieu doit être de l'ordre de la millimole. Il est important pour le bon déroulement du cycle cellulaire (reproduction) et c'est un cofacteur pour l'alcool déshydrogénase. La supplémentation en zinc dans les moûts de brasserie a généralement pour effet d'accélérer la fermentation, ainsi que de prévenir des arrêts de fermentation prématurés (White, 2012). En général, une teneur de 100 ppm de zinc dans le milieu assure un bon déroulement de la fermentation.

1.6.6 Les facteurs environnementaux influençant la croissance des levures

Température

La température est un paramètre environnemental qui influence beaucoup la croissance des levures. Salvado *et al.*, (2011) ont modélisé la croissance de 27 souches de levure (*Saccharomyces* et non *Saccharomyces*). Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* se sont révélées capables de se développer à haute température avec des températures de croissance optimales de 32,3°C et des températures maximum de croissance de 45,4°C. Concernant une souche de *Saccharomyces kudriavzevii* et une de *Saccharomyces bayanus var. uvarum*, les valeurs optimales de croissance sont de 23,6 et 26,2°C et les maximum de 36,8 et 38,4°C, respectivement, confirmant que ces deux espèces sont plus psychrophiles que *Saccharomyces cerevisiae*. En ce qui concerne la température minimale de croissance, ce paramètre peut varier de 1,3°C (*Saccharomyces cariocanus*) à 4,3°C (*Saccharomyces kudriavzevii*). Selon Tai *et al.* (2007), la température optimale de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* est comprise entre 25 et 35°C. L'exposition à une température inférieure à la température optimale de croissance ralentit fortement les cinétiques enzymatiques du métabolisme avec des conséquences sur la cinétique de croissance et la respiration. Les températures inférieures à 15°C ont un effet sur l'allongement de la phase de latence des levures comme *Saccharomyces cerevisiae*. La production d'éthanol est plus importante quand les températures sont élevées et à températures plus faibles on observe une grande production de métabolites secondaires (Torija *et al.*, 2003). *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces carlsbergensis* se sont montrées capables de fermenter du glucose à 46°C avec une valeur du taux de croissance maximal de 0,09h⁻¹ et de 0,07h⁻¹ respectivement (Szczodrak et Targoński, 1988).

pH

La plupart des levures comme *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de se développer à des valeurs de pH comprises entre 2,5 et 8,5. Ce sont des micro-organismes acidophiles, leur pH optimum de croissance est acide (Carmelo *et al.*, 1996). La plage de pH optimale pour la croissance des levures peut varier de pH 4,0 à 6,0 selon la température, la présence d'oxygène, le milieu de culture et la souche de levure (Narendranath et Power, 2005). Pour des valeurs de pH inférieures à 3,5, *Saccharomyces cerevisiae* maintient un pH interne relativement neutre via un processus mettant un jeu une ATPase transmembranaire consommant de l'ATP qui permet de pomper les protons hors de la cellule (Carmelo *et al.*, 1997).

a_w

Contrairement aux bactéries, la majorité des levures et des moisissures sont capables de croître dans des milieux présentant une activité de l'eau inférieure à 0,9 (Oyewole et Isah, 2012). Des valeurs limites de l' a_w de 0,96 et 0,88, ont été déterminées pour des souches de *Pichia kluyveri* isolées de jus de raisin (Rousseau et Doneche, 2001).

Acides organiques

L'acide acétique et l'acide lactique sont connus pour avoir des propriétés antifongiques en milieu acide (Narendranath *et al.*, 2001). L'effet de ces deux acides sur la croissance de deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* a été étudié. Une diminution de 80% du rendement de conversion en biomasse du glucose a été mesurée dans un milieu de culture à 2% de glucose contenant 7,5 g.L⁻¹ d'acide acétique (0,125 M) ou 38g.L⁻¹ (0,42 M) d'acide lactique.

La toxicité n'est pas due à la concentration en protons mais à celle de la forme indissociée de ces deux acides. Compte tenu de la valeur du pKa de ces deux acides, pour une même concentration, la concentration en acide acétique indissocié est deux à quatre fois plus grande que celle de l'acide lactique quand le pH du milieu est compris entre 4 et 6 ce qui explique pourquoi l'acide acétique est plus antimicrobien que l'acide lactique. L'effet de ces deux acides étant synergique (Narendranath *et al.*, 2001).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'effet inhibiteur de l'acide acétique intervient uniquement à bas pH et quand la teneur en glucose est suffisamment élevée, soit en métabolisme fermentaire du fait de l'effet glucose. A faible concentration en glucose, en respiration, l'acide acétique est métabolisé (Mollpouret Piper, 2006). La fermentation alcoolique d'une bouillie de maïs conduite par une souche de *Saccharomyces cerevisiae*, a été totalement inhibée à pH<5 et à une concentration d'acide acétique >0,8% alors que l'inhibition est partielle à pH 4 pour des teneurs en acide lactique de 3% (Graves *et al.*, 2006).

Éthanol

Il est acquis depuis déjà longtemps que l'éthanol inhibe la croissance des souches de levure en particulier celle de *Saccharomyces cerevisiae*. Trois effets ont été décrits : l'inhibition de la multiplication cellulaire, l'inhibition de la fermentation alcoolique et la mort cellulaire. La concentration minimale inhibitrice étant comprise entre 90 et 100 g.L⁻¹ d'éthanol (Moulin *et al.*, 1980). En vinification, depuis une décennie la tendance est à la production de vins plus alcoolisés du fait de la richesse accrue en sucre du jus de raisin ce qui peut conduire à des vins titrant 14°alcoolique voire plus. Ce phénomène s'est accompagné de la sélection de souches

de *Saccharomyces cerevisiae* capables de fermenter complètement des jus de raisin contenant jusqu'à 250g.L^{-1} de sucres fermentescibles (Ciano et Maccarelli, 1997). Comme toutes les souches de levure non-saccharomyces, celles appartenant à l'espèce *Pichia kluyveri* ne sont jamais isolées du moût de raisin en fin de fermentation alcoolique car leur croissance est inhibée dès le début de la fermentation alcoolique quand la teneur en éthanol ne dépasse pas 5 à 6% (Bezerra-Bussoli *et al.*, 2013).

1.7 Modélisation de la croissance microbienne

1.7.1 Définition du modèle

Un modèle permet de mettre en évidence la distinction entre objet biologique étudié et objet mathématique symbolique. Un modèle est une représentation simplifiée de la réalité, décrivant un phénomène, en facilitant la prédiction ou l'estimation et permettant parfois l'analyse des mécanismes à l'origine du phénomène. Toute la réalité ne pouvant être modélisée, un choix doit être fait sur la partie de la réalité à modéliser. L'espace du modèle est alors défini. Ceci implique que les informations qui pourront être extraites de la modélisation ne seront valables que pour l'espace choisi (Corn, 2010).

1.7.2 Courbe de croissance microbienne en milieu non renouvelé

La croissance microbienne se traduit par une augmentation en nombre des micro-organismes. Concernant l'évolution de la population, celle-ci est généralement représentée par le logarithme népérien de la population en fonction du temps, généralement exprimé en heures. Cette représentation est appelée courbe de croissance (figure 9), elle comporte 7 phases distinctes identifiées par Buchanan en (1918).

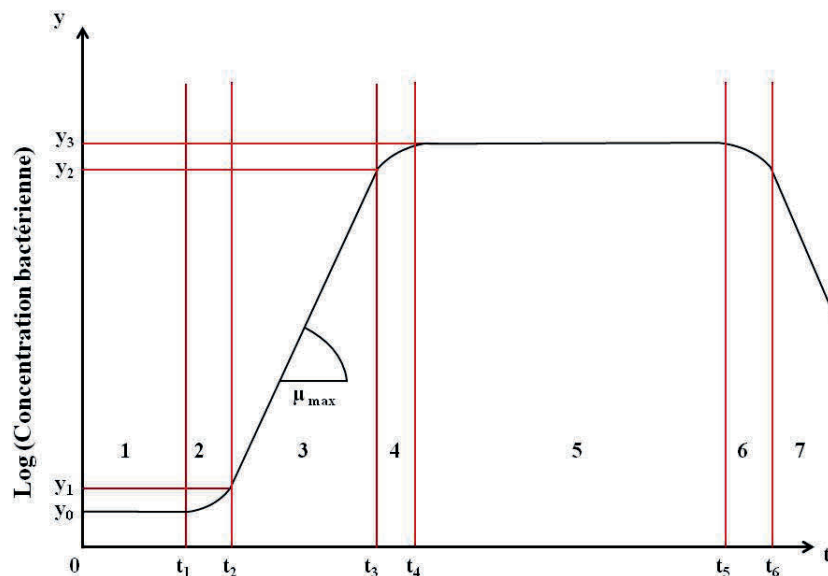


Figure 9 : Courbe de croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé.

(1) La phase de latence

C'est un phénomène inhérent à la croissance microbienne. Il s'agit d'une réponse de la population microbienne observé lors du changement (soudain) de conditions environnementales. Le temps de latence est souvent considéré comme une période d'adaptation pendant laquelle les cellules se modifient afin de tirer profit du nouvel environnement et démarrer une croissance exponentielle (Swinnen *et al.*, 2004). Dans les procédés fermentaires, le raccourcissement ou l'absence de la phase de latence est un enjeu important car cela impacte directement la productivité du procédé. C'est un temps pendant lequel, la matière première court un risque de contamination ou de développement non désiré de la microflore sauvage pouvant être présente dans la matière première.

Les facteurs influençant la durée du temps de latence sont nombreux et variés. Les variations de conditions environnementales ont une influence très importante mais la nature et le phénotype du microorganisme, l'état physiologique des cellules, la taille de l'inoculum sont aussi des facteurs jouant un rôle important (Augustin et Carlier, 2000 ; Sanaa, 2002). Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'effet de variations de conditions environnementales telles que la température, la vitesse de changement d'environnement, le pH et l'activité de l'eau (Du Preez, 1994; Le Marc *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). Toutes ces études vont dans le même sens, plus les variations sont brusques et plus elles sont importantes, plus les temps de latence sont longs.

Il existe différentes méthodes pour déterminer la valeur du temps de latence à partir de la mesure de l'évolution de la population microbienne, selon la définition qui en est faite. Buchanan et Solber (1972) ont défini le temps de latence comme le temps nécessaire pour doubler la densité de la population initiale ($\lambda=2X_0$). Pirt (1975) définit le temps de latence comme la période de transition où la vitesse spécifique de croissance augmente jusqu'à sa valeur maximale μ_{max} . Étant donné la forme typique de la courbe de croissance observée (figure 10), la durée du temps de latence peut être obtenue par l'intersection de la tangente à la courbe de croissance en phase exponentielle et du niveau de population initiale N_0 .

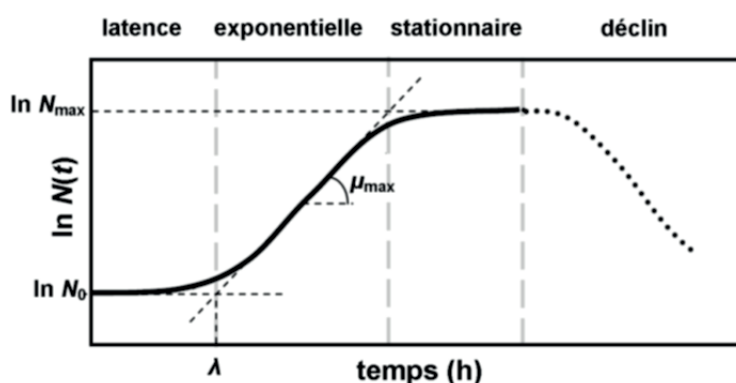


Figure 10 : Méthode de détermination de la durée de la phase de latence selon Pirt (1975).

Pour Zwietering *et al.*, (1993) seul l'emploi de cette méthode permet la comparaison avec les valeurs de la littérature. Bien que cette définition soit la plus utilisée de nos jours, elle est quelquefois difficile d'emploi quand la courbe de croissance n'a pas l'allure d'une sigmoïde parfaite rendant difficile le tracé de la seule tangente possible à la phase exponentielle qui peut varier pour un même jeu de données expérimentales et donner des valeurs de la phase de latence différentes. En 1990, Buchanan et Cygnarowicz (1990) ont proposé, estimant que la fin du temps de latence correspondait au temps pour lequel, le changement de la vitesse spécifique de croissance est maximal, ce qui correspond au premier point de la courbe de la seconde dérivée du log de la population en fonction du temps qui s'annule.

Il apparaît que la détermination du temps de latence peut varier selon la définition choisie qui dicte la méthode employée pour sa détermination, à cela s'ajoutent des difficultés liées à la méthode utilisée pour quantifier la biomasse. Les méthodes généralement employées sont le dénombrement de la population avec culture et la turbidimétrie basée sur des mesures d'absorbance. Plusieurs auteurs ont comparé l'impact des deux méthodes sur la détermination du temps de latence. Ils ont obtenu systématiquement des valeurs plus faibles en utilisant la

turbidimétrie. La différence entre les deux méthodes pouvant s'expliquer par la prise en compte de l'augmentation de la taille des cellules et non du nombre de cellules pendant le temps de latence (El Hajji, 2010).

(2) La phase d'accélération

C'est le début de la multiplication des cellules. Elle commence à partir de l'adaptation effective des cellules à leurs nouvelles conditions de culture. Durant cette phase, la vitesse de croissance (μ) augmente, jusqu'à atteindre sa valeur maximale (μ_{max}).

(3) La phase exponentielle

Pendant cette phase linéaire, les micro-organismes se développent et se multiplient à la vitesse maximale qui reste constante et qui ne dépend que de leur potentiel génétique, de la composition du milieu de culture et des conditions de culture. La pente de la droite correspond au taux spécifique maximal de croissance, μ_{max} (h^{-1}) donné par l'équation (1) :

$$\mu_{max} = \frac{Ln_2 - Ln_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

(4) La phase de décélération

Elle est due à l'épuisement des ressources nutritives du milieu et à l'accumulation des produits du métabolisme qui inhibent la croissance microbienne. Pendant cette phase, la vitesse de croissance décroît progressivement jusqu'à l'arrêt de la croissance.

(5) La phase stationnaire

Pendant cette phase, la vitesse de croissance de la population est nulle ($\mu=0$), la population est à son niveau maximum et demeure stationnaire. Elle peut correspondre effectivement à un arrêt total de la multiplication des cellules mais aussi résulter d'un équilibre entre le nombre de nouvelles cellules qui apparaissent et le nombre de cellule qui meurent et qui sont lysées. Cette phase peut durer de plusieurs heures à plusieurs jours.

Les deux dernières phases identifiées à savoir la phase de début d'accélération de la décroissance (6) et la phase de décroissance exponentielle (7) ne sont pas à proprement parler des phases de croissance. Elles correspondent à la disparition des cellules du milieu de culture par lyse cellulaire. Pendant la phase (7) la vitesse de mortalité est constante et sa durée dépend du micro-organisme et des conditions de culture. Chez les bactéries lactiques la lyse cellulaire

peut intervenir rapidement alors qu'elle est beaucoup plus lente chez les levures, en particulier chez *Saccharomyces cerevisiae* du fait de la constitution de la paroi de ces levures qui n'étant pas lysée rapidement, laisse l'impression d'avoir toujours des levures vivantes visibles au microscope (ghosts).

1.7.3 Modèles de croissance microbienne

La croissance microbienne est un phénomène globalement très complexe par le nombre et la variété des réactions mises en jeu au cours de son déroulement et par leur dépendance vis à vis des conditions extérieures. Traditionnellement, on distingue deux grands groupes de modèles dans le domaine du génie microbiologique : les modèles structurés et les modèles non-structurés. Les modèles structurés sont des équations mathématiques qui prennent en compte la structure et la composition du microorganisme (C, N, O). Ces types de modèles sont généralement complexes et requièrent une connaissance précise du fonctionnement des différentes structures de la cellule. Ils entraînent de plus une multiplication des paramètres du modèle ce qui pose souvent des problèmes d'identification quand des données expérimentales relatives à des composés intracellulaires ne sont pas disponibles.

Les modèles non-structurés s'appuient sur une vision globale de la cellule, sans détailler sa structure. Ainsi, la composition cellulaire est alors considérée comme constante et la notion de biomasse totale prime. Dans ce type de modèles, la variation de biomasse est exprimée par l'intermédiaire de variables extracellulaires distinctes (concentration en substrats, en produits du métabolisme et présence d'inhibiteurs de la croissance), ainsi que de certaines variables environnementales (pH, température, force ionique, etc.).

Dans les modèles non structurés qui considèrent la biomasse dans son ensemble, sans distinguer les différents états physiologiques des différentes cellules, la croissance est caractérisée par des paramètres tels que le temps de latence, le taux de croissance et le temps de génération.

On distingue les modèles primaires ou modèles dynamiques, des modèles secondaires qui décrivent l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres des modèles primaires. Ainsi, un modèle reliant le taux de croissance d'un micro-organisme à la température, le pH, etc., sera dit secondaire.

1.7.3.1 La modélisation primaire

Les premiers modèles publiés décrivant la croissance de micro-organismes ont été pour la plupart des modèles empiriques. Depuis des modèles dits mécanistes ont été développés.

Les modèles empiriques sont construits pour décrire le mieux possible un nuage de points. Ces modèles sont de type “boîte noire”. Ils correspondent en général à une démarche phénoménologique, fondée uniquement sur l’observation des effets et non sur la compréhension des mécanismes. A contrario, les modèles mécanistes sont construits à partir d’hypothèses expliquant les processus donnant lieu aux phénomènes observés (Corn, 2010).

Le premier modèle de croissance d’une population est celui de Malthus (1798) (équation 2), pour qui l’augmentation d’une population si elle n’est pas freinée a une progression géométrique,

$$n = n_0 e^{Kt} \quad (2)$$

Avec n la population à l’instant t et n_0 la population initiale, K est la constante de croissance. Le modèle de Malthus d’évolution d’une population ne prend pas en compte divers facteurs qui interviennent dans le développement et la dynamique : (i) la limitation du milieu nutritif ou spatial ; (ii) les inhibitions ou interactions dues à la proximité d’un grand nombre d’individus ; (iii) les régulations biologiques.

Pour affiner ce modèle, Verhulst (1838) propose une équation différentielle, afin de modéliser la croissance d’une population animale qui voit sa vitesse de croissance s’arrêter au cours du temps quand elle arrive à un niveau maximal. Pour une croissance microbienne, cette loi logistique est donnée par l’équation 3 (Lonvaud *et al.*, 2010).

$$\frac{dn}{dt} = \mu_{max} \cdot n \left(1 - \frac{n}{n_{max}}\right) \quad (3)$$

Avec n la population à un instant t , μ_{max} , la vitesse de croissance maximale et n_{max} le niveau de population maximale qui dépend des disponibilités en nutriments du milieu de culture.

Le modèle de Gompertz modifié par Zwietering *et al.*, (1990), a été initialement largement utilisé en microbiologie prévisionnelle, soit l’équation (4) :

$$\ln(x) = \ln(x_0) + A \cdot \exp \left[-\exp \left[\frac{\mu_{max} e}{A} (lag - t) + 1 \right] \right] \quad (4)$$

Avec x et x_0 la population en UFC.mL⁻¹ au temps t et à $t = 0$, $A = \ln(x_{max}) - \ln(x_0)$; lag est la durée de la phase de latence en heures.

Certains auteurs, notamment Rosso *et al.*, (1995), ont émis des réserves à propos de ce modèle qui induit une surestimation du taux de croissance par rapport à la définition classique de μ_{max} .

De plus la valeur de x_0 , soit la valeur de la population à $t = 0$ donnée par le modèle est différente de celle mesurée.

Baranyi et Roberts, (1994) ont développé un modèle de croissance bactérienne (équation 5)

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max} \alpha_n(t) \left[1 - \frac{x}{x_{max}} \right] \quad (5)$$

$$\text{Avec } \alpha_n(t) = \frac{t^n}{lag + t^n}$$

L'estimation de la valeur de n pouvant poser des difficultés, Baranyi et Roberts, (1994) proposent de la fixer à 4. Ce modèle semble être un meilleur descripteur des cinétiques microbiennes que le modèle de Gompertz. Les paramètres sont consistants par rapport aux définitions proposées. Un des inconvénients du modèle de Baranyi réside dans sa complexité.

Des modèles plus simples ont donc été développés, ainsi Rosso *et al.*, (1995) qui ont proposé un modèle logistique avec délai et rupture (équation 6) qui est depuis largement utilisé en microbiologie prédictive.

$$\begin{cases} \frac{dNt}{dt} = 0 & \text{if } t \leq \lambda \\ \frac{dNt}{dt} = \mu_{max} \cdot Nt \left(1 - \left(\frac{Nt}{N_{max}} \right) \right) & \text{if } t > \lambda \end{cases} \quad (6)$$

Avec Nt et N_{max} en UFC.mL⁻¹, les valeurs de population au temps t et en fin de croissance ; μ_{max} le taux de croissance maximal en h⁻¹ et λ la durée de la phase de latence en heures.

1.7.3.2 Le modèle de Monod

Le modèle de croissance de Monod (1941) donne une relation entre le taux de croissance d'une population de micro-organismes et la concentration d'un substrat limitant alors que tous les autres nutriments sont en excès (équation 7).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{K_s \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad (7)$$

Avec $[S]$ la concentration en substrat limitant, μ_{max} représente le taux de croissance maximum et K_s la concentration en substrat telle que la vitesse de croissance μ soit demi-maximal.

Le modèle de Monod, s'applique bien aux situations dans lesquelles un substrat est limitant mais pour de nombreux micro-organismes, un substrat limitant à faible concentration peut être inhibiteur à une concentration plus importante. Dans cette situation, le modèle de Monod ne permet pas une bonne représentation de cet effet. Divers modèles adaptés de celui de Monod, ont été proposés pour prendre en compte l'effet de l'inhibition par excès de substrat (Song *et al.*, 2008) (équation 8).

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{\left\{[S]+K_s+\left(\frac{[S]^2}{K_i}\right)\right\}} \quad (8)$$

Avec K_i ($g L^{-1}$), la constante d'inhibition, $[S]$ la concentration en substrat, et μ_{max} le taux de croissance maximal (h^{-1}).

1.7.3.3 Les modèles secondaires

La modélisation secondaire consiste à relier l'effet des facteurs environnementaux (température, pH, concentrations d'inhibiteurs) au taux de croissance (μ_{max}). On peut distinguer deux approches méthodologiques :

La première consiste à décrire simultanément l'effet de tous les facteurs environnementaux à l'aide de fonctions polynomiales. Le développement de ces modèles empiriques se fait de façon systématique selon un plan d'expérience défini et dans une gamme de variation donnée (Lebert *et al.*, 2000; Watier *et al.*, 1996). Cette approche permet d'obtenir dans tous les cas un modèle prenant en compte les interactions entre les différents facteurs. Cependant ces modèles sont souvent peu robustes (Baranyi *et al.*, 1996).

La seconde approche, que nous appellerons modulaire, consiste à modéliser individuellement l'effet de chaque facteur. A partir de ces modules simples, un modèle général prenant en compte l'effet combiné de l'ensemble des facteurs environnementaux est ensuite élaboré.

Cette dernière approche présente de nombreux avantages : les modèles sont en général définis par un petit nombre de paramètres. Au moins une partie de ces paramètres ont une signification biologique simple. Ils apparaissent aussi plus robustes que les modèles polynomiaux. C'est donc l'approche modulaire qui semble offrir les meilleures perspectives.

Zwitering *et al.*, (1993) ont proposé un modèle assez simple appelé « modèle Gamma », décrivant le taux de croissance μ_{max} relativement à sa valeur maximale μ_{opt} obtenue pour des conditions optimales de culture particulières (équation 9):

$$\mu_{max} = \mu_{opt} * \gamma(T) * \gamma(pH) * \gamma(a_w) \quad (9)$$

Chaque fonction γ décrit l'effet relatif (compris entre 0 et 1) d'un facteur environnemental qui agit sur la croissance de la souche microbienne et considéré indépendamment des autres facteurs et de l'état physiologique de la souche microbienne en particulier indépendamment de la phase de croissance dans laquelle serait le micro-organisme.

Concernant la valeur du gamma température en zone suboptimale, μ_{max} est supposé varier avec le carré de la température (équation 10) :

$$\mu_{max} = (b(T - T_{min}))^2 \quad (10)$$

L'équation (11) est celle obtenue quand T prend sa valeur optimale,

$$\mu_{opt} = (b(T_{opt} - T_{min}))^2 \quad (11)$$

L'effet relatif de la température $\gamma(T)$ s'obtient en divisant les valeurs de μ_{max} à la température T par la valeur de T_{opt} (équation 12) :

$$\gamma(T) = \left(\frac{T - T_{min}}{T_{opt} - T_{min}} \right)^2 \quad (12)$$

Les effets relatifs au pH $\gamma(pH)$ (équation 13) et de l'activité de l'eau $\gamma(a_w)$ (équation 14) s'obtiennent de façon similaire :

$$\gamma(pH) = \frac{pH - pH_{min}}{pH_{opt} - pH_{min}} \quad (13)$$

$$\gamma(a_w) = \frac{a_w - a_{wmin}}{1 - a_{wmin}} \quad (14)$$

L'effet combiné de l'ensemble des facteurs est supposé pouvoir être décrit par la multiplication de l'effet de chacune des contributions.

Le modèle cardinal noté CTPM (équation 15) développé par Rosso *et al.*, (1993, 1995) est un autre exemple de modèle construit selon l'approche modulaire. L'effet de la température sur μ_{max} est décrit par un module (appelé CTM, « Cardinal Temperature Model ») défini par les températures cardinales de croissance (T_{min} , la température minimale, T_{max} , la température maximale, T_{opt} , la température à laquelle le taux de croissance est le plus élevé ce qui correspond au nombre de génération par heure le plus grand :

$$T = \begin{cases} T < T_{min}, & 0 \\ T_{min} < T < T_{max} & \frac{(T - T_{min})^2 (T - T_{max})}{(T_{opt} - T_{min})((T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T))} \\ T > T_{max}, & 0 \end{cases} \quad (15)$$

De la même façon, une fonction (appelée module CPM, « Cardinal pH Model ») définie pour les pH cardinaux est utilisée pour décrire l'effet du pH sur le taux de croissance (équation 16) :

$$pH = \begin{cases} pH < pH_{min}, & 0 \\ pH_{min} < pH < pH_{max} & \frac{(pH-pH_{min})(pH-pH_{max})}{(pH-pH_{min})(pH-pH_{max})-(pH-pH_{opt})^2} \\ pH > pH_{max}, & 0 \end{cases} \quad (16)$$

Les fonctions $\rho(T)$ et $\gamma(pH)$ proposées par Rosso *et al.*, (1995) représentent comme dans le modèle de Zwietering *et al.*, (1993) les effets relatifs de la température et du pH. Comme pour le modèle Gamma, l'effet combiné de ces facteurs sur μ_{max} est obtenu en multipliant leurs effets séparés (équation 17) :

$$\mu_{max} = \mu_{opt}\gamma(pH)\rho(T) \quad (17)$$

Rosso (1998) a proposé de décrire l'effet de l' a_w sur μ_{max} par le module suivant (équation 18) (Lebert et Lebert, 2006) :

$$\delta(a_w) = \begin{cases} a_w < a_{wmin}, & 0 \\ a_{wmin} < a_w, & \frac{(a_w-a_{wmin})^2(a_w-1)}{(a_{wopt}-a_{wmin})((a_{wopt}-a_{wmin})(a_w-a_{wopt})-(a_{wopt}-1)(a_{wopt}+a_{wmin}-2a_w))} \end{cases} \quad (18)$$

La présence de molécules capables d'inhiber la croissance de souche microbienne peut être prise en compte dans le gamma modèle. Coroller *et al.*, (2005) ont proposé un modèle (équation 19) permettant de prendre en compte l'effet de la concentration de différents acides organiques non dissociés sur la croissance de souches bactériennes pathogènes.

$$\gamma([AH]) = 1 - \left(\frac{[AH]}{MIC}\right)^\alpha \quad (19)$$

Avec $[AH]$, la concentration en acide organique non dissocié, MIC la concentration minimale inhibitrice de l'acide considéré. La valeur du coefficient α dépendant de l'acide utilisé et de la souche bactérienne étudiée ainsi, pour *Listeria monocytogenes* sa valeur est de 1,07 pour l'acide lactique.

Dans l'approche cardinale, le temps de latence est déduit de la corrélation entre λ et l'inverse de μ_{max} (équation 20) (Swinnen *et al.*, 2004).

$$\mu_{max} \cdot \lambda = \alpha + \beta \mu_{max} \quad (20)$$

Le produit $\mu_{max} \cdot \lambda$ représentant le travail que doit accomplir la souche pour répondre à son nouvel environnement.

1.7.3.4 Modélisation de la formation de produit

Les cinétiques de formation des produits microbiens peuvent être divisées en trois groupes, qui correspondent chacun à un comportement métabolique différent (El Hajji, 2010). Ainsi, l'apparition d'un produit peut être :

Liée à la croissance quand le produit est formé simultanément à la biomasse. Dans ce cas, les vitesses spécifiques de formation du produit (V_p) et de croissance sont proportionnelles (équation 21) :

$$\frac{P}{n} = V_p = \alpha \cdot \mu_{max} \quad (21)$$

Dissociée de la croissance quand un métabolite est produit lors de la phase stationnaire alors que la vitesse de croissance est nulle. Cette fois, la vitesse spécifique de formation du produit est constante (équation 22) :

$$X = V_p = \beta \quad (22)$$

Partiellement associée à la croissance quand la formation du produit est présente lors de la phase de croissance et lors de la phase stationnaire. Ainsi, la vitesse spécifique de production peut être exprimée selon le formalisme mathématique complet proposé par Luedeking et Piret, (1959) (équation 23) :

$$\frac{dP}{d_T} = \alpha \frac{dn}{dt} + \beta x \quad (23)$$

Où $\frac{dP}{d_T}$ est la vitesse de formation de produit, α est la formation du produit associée à la croissance et β est la formation du produit associée à la non croissance (n).

Monteagudo *et al.*, (1994) ont utilisé le modèle (équation 24) donné par Luedeking et Piret, (1959), en rajoutant un terme indiquant la dépendance de la vitesse de production d'acide lactique à la concentration d'un inhibiteur ici l'acide lactique. Le modèle a la forme suivante :

$$\frac{dP}{d_T} = \left(\alpha \frac{dn}{dt} + \beta x \right) \left(1 - \frac{P}{P_{max}} \right) \quad (24)$$

1.7.4 Modélisation de cultures mixtes

A quelques rares exceptions, les fermentations sont traditionnellement conduites par des populations microbiennes complexes, diverses et inconstantes naturellement présentes dans la matière première ou dans l'environnement des ateliers de production. La plupart des matières

premières utilisées dans les fermentations alimentaires sont hétérogènes en composition et en structure ce qui contribue à l'existence de « niches » occupées simultanément par différents micro-organismes adaptés à celles-ci. On peut citer pour l'exemple, la présence de différentes sources de carbone dont l'assimilation diffère d'une souche à l'autre. Ces différentes souches qui coexistent et interagissent, constituent une communauté microbienne dont le bon fonctionnement impacte directement la qualité du produit final. Dans ces conditions, la qualité finale compte tenu de la variabilité des microflore n'est pas constante. A contrario, l'utilisation de starter monosouche associé à la stérilisation ou la pasteurisation permet de faire fermenter les aliments par des germes microbiens devenus majoritaires artificiellement, qui dans d'autres situations ne l'aurait pas été pour conduire à des produits de qualité constante mais ayant perdu en typicité et en richesse sensorielle. Les travaux relatifs à la modélisation des fermentations mixtes ont vraiment débuté dans les années 1980, quand le développement de modèles mathématiques tenant compte de la diversité des micro-organismes impliqués et de leurs interactions est apparu comme une voie à privilégier pour comprendre le fonctionnement des écosystèmes microbiens lors de la production d'aliments fermentés et pouvoir enrichir l'offre en starters mixtes. C'est aussi apparu comme la possibilité d'industrialiser la production d'aliments qui ne sont fermentés que par des associations de souches microbiennes qui agissent simultanément ou qui se relaient. Le gowé est un bon exemple de ce type de fermentation complexe comme le cacao qui est fermenté par des levures et des bactéries acétiques.

1.7.4.1 Interactions entre microorganismes

Il existe deux grandes familles d'interactions qui se produisent entre les microorganismes : ce sont les interactions directes et les interactions indirectes.

Interactions directes

Les interactions directes impliquent un contact physique entre deux populations. Il s'agit des interactions de prédation, parasitisme et inhibition par contact direct entre les différents microorganismes

Prédation et parasitisme

Pour ces deux types d'interactions, une des espèces est dépendante des activités de l'autre. Dans le cas de la prédation, la proie devient un substrat totalement digéré par le prédateur. Alors que dans le cas du parasitisme, seule une partie des tissus de la victime est consommée. Ainsi les bactériophages, sont des virus qui parasitent les bactéries.

Inhibition par contact direct entre les cellules

D'après Nehme, (2008) ce type d'inhibition résulte du contact direct entre les cellules de la population inhibitrice, plus nombreuse que la population inhibée, et non de la limitation en nutriment, ni de la présence de métabolites extracellulaires inhibiteurs. Cette interaction a été observée chez *Kluyveromyces thermotolerans* et chez *Torulaspora delbrueckii* en culture mixte avec *Saccharomyces cerevisiae*. Les mécanismes de cette inhibition ne sont pas connus (Nissen *et al.*, 2003).

Interactions indirectes

Les interactions indirectes sont dues à des métabolites extracellulaires et comprennent le neutralisme, le mutualisme, le commensalisme, l'amensalisme et la compétition (Sieuwerts *et al.*, 2008).

Mutualisme

Le mutualisme est classé en deux types : mutualisme (symbiose) et synergisme (proto-coopération) durant lesquels chaque microorganisme est stimulé par la présence de l'autre. La symbiose est le processus où la présence de chaque microorganisme est indispensable pour la survie de l'autre. La proto-coopération est le processus où l'absence d'un des microorganismes n'est pas fatale pour l'autre, mais l'association entre les deux populations stimule et améliore leur développement. Dans la fabrication du yaourt, l'interaction entre *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* est typiquement un cas de proto-coopération dont les métabolismes réciproques déterminent fortement la qualité sensorielle du yaourt (Angelov *et al.*, 2009).

Neutralisme

C'est quand la présence d'une population n'affecte pas l'autre. Aucun changement dans la croissance des populations n'est observé dans le cas du neutralisme. Ce type d'interaction n'est possible que si aucun des substrats n'est limitant ou si les espèces ont des besoins nutritionnels complètement différents.

Commensalisme

C'est quand une des populations profite de la présence d'une autre. Cela peut avoir lieu si une des populations produit une substance nécessaire pour la croissance de l'autre ou si une des populations consomme une substance inhibitrice de la croissance de l'autre.

Amensalisme

Ce phénomène a lieu quand une des populations produit un métabolite qui a un effet négatif sur la croissance d'autres populations. Un exemple d'amensalisme chez les levures est l'effet Killer dû à la production d'une toxine killer produite par certaines souches de levure comme *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia kluyveri*. La toxine killer entraîne la lyse des souches sensibles sans altérer la viabilité de la souche productrice (Polonelli et Morace, 1986). Pour les bactéries, l'exemple est la capacité à produire des bactériocines qui provoquent la lyse d'autres souches de bactéries lactiques (Sieuwertz *et al.*, 2008) ou de souches bactériennes d'autres espèces. Pour l'exemple on peut citer la nisine qui inhibe la croissance de *Staphylococcus aureus* (Hampikyan, 2009).

Compétition

Dans ce type d'interaction, les populations consomment toutes un ou plusieurs nutriments communs nécessaires à leur croissance ce qui aura un effet négatif sur leur vitesse de croissance. Un exemple souvent cité est celui des bactéries malolactiques qui dégradent le malate en lactate dans les vins comme *Leuconostoc oeni*, et qui se développent après la fermentation alcoolique, lorsque *Saccharomyces cerevisiae* est en phase stationnaire (Fahimi, 2012).

1.7.4.2 Les modèles de culture mixte

L'intérêt de pouvoir utiliser des modèles adaptés aux cultures mettant en jeu plus de deux espèces microbiennes est vite devenu une évidence. Les premiers modèles ont été des adaptations des modèles écologiques. Ces modèles ayant été établis pour l'étude des interactions entre les êtres vivants (animaux et les végétaux), et avec le milieu qui les entoure et dont ils font eux-mêmes partie, comme par exemple leur habitat et l'environnement. Le modèle de Lotka Volterra qui permet décrire la compétition de deux espèces sur une quantité limitée de ressources est l'un de ces modèles parmi les plus utilisés. Cependant la modélisation explicite de la phase de latence est très importante quand on s'intéresse aux micro-organismes, c'est pourquoi un modèle pour la croissance microbienne dans les produits alimentaires ne peut pas être simplement copié de ceux élaborés en écologie. Compte tenu de cela, et des particularités liées au développement des populations microbiennes, Dens *et al* (1999) proposent l'expression (équation 25) très générale pour un modèle prenant en compte les interactions entre deux espèces, soit :

$$\frac{dN_1}{dt} = \mu_1 (N_1, N_2, Q_1, Q_2, \langle S \rangle, \langle P \rangle, \langle env \rangle, \langle struct \rangle) N_1, \quad (25)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = \mu_2 (N_1, N_2, Q_1, Q_2, \langle S \rangle, \langle P \rangle, \langle env \rangle, \langle struct \rangle) N_2,$$

N_1 et N_2 étant la population en micro-organismes par unité de volume. Les valeurs des taux de croissance μ_1 et μ_2 de chacune des deux espèces dépendent de plusieurs facteurs : la densité de population des deux espèces. Q_1 , Q_2 sont en relation avec l'état physiologique des cellules, ils permettent de décrire la phase de latence de chaque espèce. L'effet sur le taux de croissance des souches des concentrations en substrat $\langle S \rangle$ (glucose, oxygène, etc.) ainsi que celui de la concentration en métabolites produits $\langle P \rangle$ lors de la croissance (acide lactique, éthanol, etc.) sont pris en compte. L'influence des conditions environnementales (env) comme la température, le pH, etc. ainsi que la structuration de la matrice alimentaire ($struct$) liquide, solide, semi solide, homogénéité, sont aussi pris en compte.

Devant l'impossibilité de pouvoir prendre en compte tous les facteurs influençant la croissance microbienne de chacune des deux souches, une simplification a été proposée qui ne prend en compte que les principaux facteurs, ce qui a conduit à l'équation (26) (Dens *et al*, 1999).

$$\begin{aligned} \frac{dN_1}{dt} &= \mu_{max1} \frac{Q_1}{1+Q_1} \frac{N_1}{N_{max1}} (N_{max1} - N_1 - \alpha_{12} N_2), \\ \frac{dN_2}{dt} &= \mu_{max2} \frac{Q_2}{1+Q_2} \frac{N_2}{N_{max2}} (N_{max2} - N_2 - \alpha_{21} N_1), \end{aligned} \quad (26)$$

$$\frac{dQ_1}{dt} = \mu_{max1} Q_1,$$

$$\frac{dQ_2}{dt} = \mu_{max2} Q_2,$$

Les paramètres N_1 , N_2 , Q_1 et Q_2 ont la même signification que dans l'équation (25). N_{maxi} est le niveau maximal de population d'une espèce quand elle est seule dans le milieu. α_{ij} est le coefficient d'interaction de l'espèce i sur l'espèce j .

1.7.4.3 Les systèmes de Lotka et Volterra

Le modèle de Lotka et Volterra trouve son origine dans les années 1920 quand ces auteurs ont initié différents travaux d'écologie mathématique dans lesquels ils ont introduit la

représentation des interactions entre espèces par des systèmes d'équations différentielles. Lotka et Volterra ont proposé le premier modèle de croissance décrivant une interaction entre deux populations (El Hajji, 2010). Ce modèle est basé sur l'hypothèse que la croissance des deux populations dépend linéairement des effectifs des deux populations, notés N_1 et N_2 . Il s'agit d'un couplage de deux modèles logistiques qui se traduit par les équations suivantes (équation 27) :

$$\begin{cases} \frac{dN_1}{dt} = \mu_{\max}^1 \left(1 - \frac{N_1 + \alpha_{12}N_2}{K_1} \right) N_1 \\ \frac{dN_2}{dt} = \mu_{\max}^2 \left(1 - \frac{N_2 + \alpha_{21}N_1}{K_2} \right) N_2 \end{cases} \quad (27)$$

La relation d'ordre entre les deux coefficients de compétitions α_{12} et α_{21} permet à elle seule de connaître l'issue de la confrontation des deux populations :

1. Si $\alpha_{12} = \alpha_{21}$, les deux espèces sont équivalentes.
2. Si $\alpha_{12} > 1 > \alpha_{21}$ ou $\alpha_{12} < 1 < \alpha_{21}$, on aura une exclusion par l'espèce dominante.
3. Si $\alpha_{12} > 1$ et $\alpha_{21} > 1$, on aura une exclusion compétitive selon les conditions initiales.
4. Si $\alpha_{12} < 1$ et $\alpha_{21} < 1$, on aura la coexistence des deux populations.

Une coexistence des deux espèces est possible si seulement leurs coefficients de compétition sont faibles (i.e. l'impact réciproque de l'une sur l'autre est faible). Cependant, les valeurs de ces coefficients de compétition dépendent de l'utilisation que fait chaque population des ressources qui leur sont communes. Comme ces ressources ne sont pas spécifiées par le modèle, les valeurs des coefficients de compétition entre deux populations ne peuvent être estimées a priori. Elles ne peuvent être connues que suite à une première confrontation. Ce modèle a donc peu de caractère prédictif. Seul un modèle prenant en compte explicitement la relation entre les populations et leurs ressources peut pallier ce défaut.

Volterra (1931) a étudié la coexistence de deux espèces se disputant la même quantité de nourriture. Il suppose que la quantité de nourriture disponible est une fonction du nombre d'individus de chaque espèce et que la vitesse de développement de chaque population en dépend (équation 28) :

$$\begin{cases} \frac{dN_1}{dt} = \mu_{\max}^1 \left(1 - \frac{Y_1}{K_1} f(N_1, N_2) \right) N_1 \\ \frac{dN_2}{dt} = \mu_{\max}^2 \left(1 - \frac{Y_2}{K_2} f(N_1, N_2) \right) N_2 \end{cases} \quad (28)$$

Avec N_1 et N_2 : nombre d'individus de l'espèce 1 et 2 ; $f(N_1, N_2)$: nutriments disponibles ; μ_{\max}^1 et μ_{\max}^2 : taux de croissance maximal de l'espèce 1 et 2 et γ_1 et γ_2 : constante positive correspondant au besoin de nutriments de l'espèce 1 et 2. Indépendamment, Lotka a proposé un système d'équations très proches. Actuellement, les deux modèles sont rassemblés sous l'expression "équations de Lotka-Volterra". Le modèle de Lotka-Volterra est aujourd'hui repris sous diverses formes.

Ce modèle a par la suite donné lieu à diverses adaptations dont on peut citer celle de Gomati (1974) qui s'appuie sur un descriptif de croissance du même type que Gompertz à la place d'une description de type logistique (El Hajji, 2010) (équation 29) :

$$\begin{cases} \frac{dN_1}{dt} = \mu_{\max}^1 \left(1 - \frac{b_1 \log(N_1) + c_1 \log(N_2)}{K_1} \right) X_1 \\ \frac{dN_2}{dt} = \mu_{\max}^2 \left(1 - \frac{b_2 \log(N_2) + c_2 \log(N_1)}{K_2} \right) X_2 \end{cases} \quad (29)$$

Mounier et al (2010), sont parmi les premiers à mobiliser en microbiologie alimentaire, le modèle de Lotka-Volterra pour mesurer les interactions de 6 espèces microbiennes intervenant lors de l'affinage de fromage.

2 Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

2.1 Microbiologie

2.1.1 Les souches microbiennes

Les souches de bactéries lactiques *L. brevis* (CNCM I-2002) et *L. plantarum* (CNCMI-3069) ont été fournies gracieusement par Lesaffre Company (Marcq-en-Baroeul, France), sous forme de bactéries sèches actives (BSA).

La souche de levure *P. kluyveri* (Viniflora-FrootZen) a été fournie gracieusement par la compagnie Chr. Hansen Company (Prades-le-Lez, France), sous forme de suspension congelée à -80°C.

2.1.2 Les milieux de culture

Milieu MRS : selon De Man, Rogosa et Sharp (De Man *et al.*, 1960) en bouillon pour la croissance des souches lactiques, à une concentration de 55,3 g.l⁻¹ et gélosé pour le dénombrement en surface des flores lactiques, 70,3 g.l⁻¹. Autoclavé à 121°C pendant 15 minutes (BIOKAR-diagnostics, Zac de Ther-Allonne, F60000-Franc).

Milieu gélosé glucosé au chloramphénicol : pour le dénombrement en surface des flores levuriennes, 40,1 g.l⁻¹. Autoclavé à 121°C pendant 15 minutes (BIOKAR-diagnostics, Zac de Ther-Allonne, F60000-France).

Milieu malt extract : en bouillon pour la croissance des souches de levures, 15 g.l⁻¹. Autoclavé à 121°C pendant 15 minutes (BIOKAR-diagnostics, Zac de Ther-Allonne, F60000-France).

Milieu YEP : Extrait de levure : 10g.l⁻¹ ; Bactopeptone 20 g.l⁻¹, pH 6 et tamponné avec du tampon phosphate 1M.

Milieu YEPG : Extrait de levure : 10g.l⁻¹ ; Bactopeptone 20 g.l⁻¹ ; glucose 5 g.l⁻¹, pH 5 tamponné avec le tampon phosphate à 1M.

2.1.3 Étude de la croissance des souches microbiennes

2.1.3.1 Croissance en fermenteurs

En fermenteurs Minifor de la marque Lambda (LAMBDA Laboratory Instruments, Baar, SWITZERLAND), avec contrôle et enregistrement de la température et du pH, la croissance

microbienne est mesurée en continu par un capteur de turbidité à infrarouge Optek FC20-ASD19-N (Elscolab, Arcueil-France). La population est exprimée en UFC.ml⁻¹ en fonction d'une courbe de calibration pré-établie pour chaque souche.

2.1.3.2 Croissance en microplaque

Utilisation d'un lecteur de microplaques Bioscreen C, type FP-1100-C (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette 91-France). Les plaques sont de 100 puits de 300 µl de volume utile et la turbidité est mesurée à 600 nm. L'agitation et la température sont contrôlées.

2.1.3.3 Détermination des valeurs cardinales minimales du pH et de la température sur milieu MRS agar

Les valeurs cardinales minimales de pH et de température des bactéries lactiques, ont été déterminées après le dépôt d'une pré-culture de chaque souche sur milieu MRS agar. Pour les valeurs minimales de pH, le milieu a été tamponné à une gamme de pH de 2,8 à 4 et incubé à 37°C pendant 48 h en anaérobiose créée par un kit Gaspak™ EZ (Laboratoires Humeau, La Chapelle-sur-Erdre 44, France). La détermination des valeurs cardinales minimales de température a été réalisée sur milieu MRS agar non tamponné incubé deux semaines à 10 et 15°C.

2.2 Analyses physico chimiques et biochimiques

2.2.1 Mesure de l'activité amylasique :

Par Starch Azur

L'effet du pH sur l'activité alpha-amylasique du malt de sorgho a été mesuré par utilisation du starch azur en utilisant les réactifs suivant :

Solution A : solution d'extraction de l'enzyme (Chlorure de sodium 1% w/v ; Chlorure de calcium 0,02% w/v et azide de sodium 0,02% w/v).

Solution B: solution tampon citrate-phosphate 0,5 M. (C₆H₈O₇ ; Na₂HPO₄.7H₂O).

Extraction des enzymes : 0,5 g de malt en suspension dans 100 ml de la solution A sont incubés et agités 15 à 20 min à température ambiante. La suspension est filtrée avec un filtre de 0,45 µm de porosité, puis 0,4 ml de l'extrait filtré sont ajoutés à 0,96 ml de la solution B. dans un tube Eppendorf de 2 ml contenant 50 mg de Starch Azur (SIGMA), mélangés et

incubés à 37°C pendant 1 h puis les tubes sont centrifugés et agités périodiquement. La réaction est stoppée avec 0,1 ml d'acide chlorhydrique 4 N, centrifuger à 7200 g pendant 1 min avant de mesurer l'absorbance à 595 nm.

Par le Kit Megazyme

L'activité des α -amylases, est déterminée par le kit de dosage (CERALPHA) à partir de la méthode Mégazyme K-CERA 08/05 (Megazyme International, Wicklow, Ireland). Le *p*-nitrophenyl maltoheptaoside incolore est hydrolysé en en *p*-nitrophénol jaune et en maltosaccharide. Le *p*-nitrophénol est dosé par spectrophotométrie à 400 nm. L'activité α -amylasique est exprimée en UC/g de matière sèche du produit.

Pour mesurer l'activité des enzymes (α -amylases) en fonction de la température, une suspension dans l'eau a été réalisée (ratio malt/eau 1 : 1) maintenue pendant 1 à 3 heures à des températures comprises entre 25 et 85°C dans un bain-marie régulé.

2.2.2 Dosage des sucres et des acides organiques par chromatographie liquide

L'acide lactique, l'éthanol, le glucose, et le maltose sont dosés par Chromatographie Liquide de Haute Performance (CLHP) avec une colonne Aminex HPX87H, par détection UV (210 nm) et réfractométrique. L'élution est réalisée à 35°C par une solution de H₂SO₄ 5 mM à un débit de 0,6 ml.min⁻¹.

2.3 Fabrication du gowé à l'échelle du laboratoire

Le schéma de fabrication du gowé (300 g) est donné par la figure 9. Le taux d'inoculation visé des starters est de 10⁶ UFC.g⁻¹. La fermentation du gowé a été conduite à 30°C avec agitation et enregistrement du pH au cours de la fermentation comme illustré sur la figure 11.

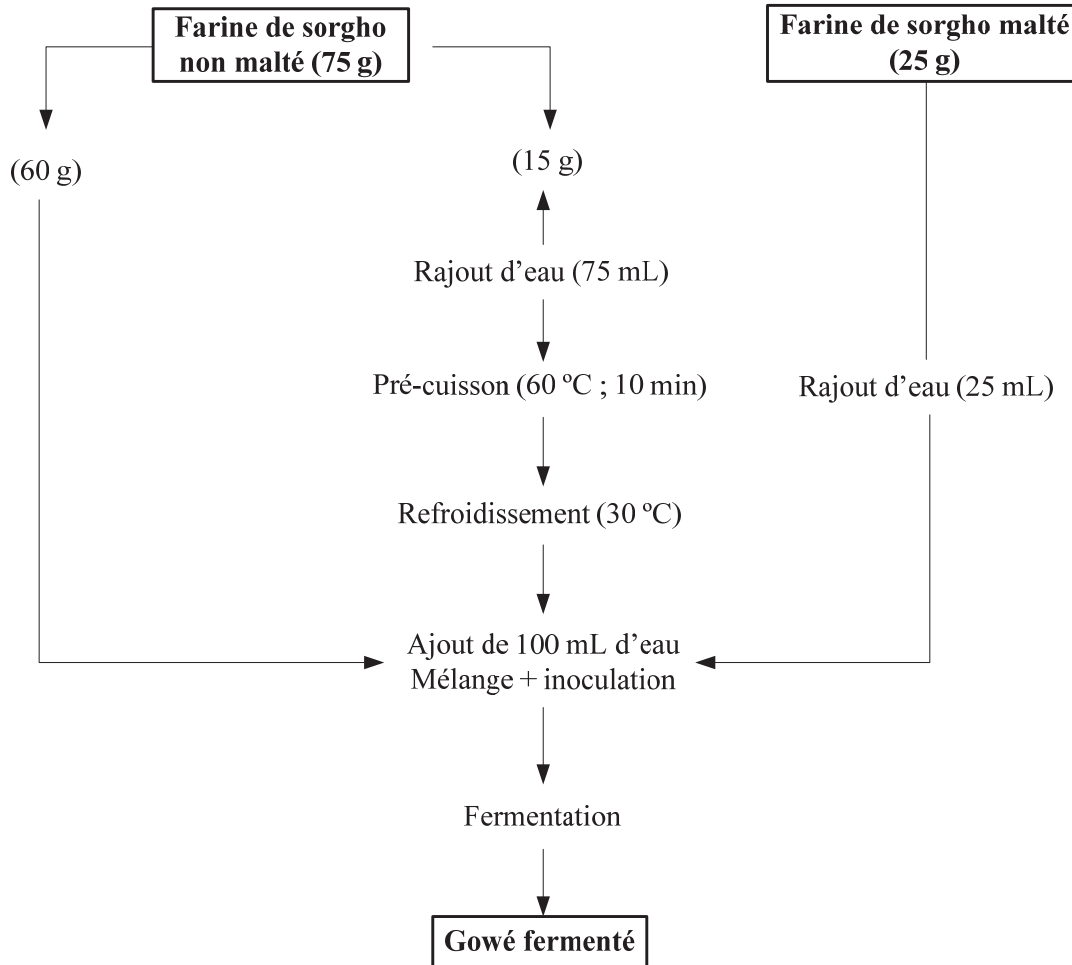


Figure 11 : Schéma de fabrication du gowé à l'échelle laboratoire selon Vieira-Dalodé et *al.*, (2007).

2.3.1 La matière première

Le sorgho utilisé est une variété rouge récoltée au Bénin en 2010. C'est une variété très utilisée pour la production locale du gowé. Les grains sont tamisés à l'aide d'un tamis de 2 mm de maille pour enlever les particules étrangères. La farine de sorgho brut a été préparée en broyant directement les grains avec un broyeur de laboratoire Mill 3100 (Perten Instruments Hagersten, Suède) équipé d'un tamis en acier inoxydable de 0,5 mm. Le maltage a été effectué au laboratoire. Les farines de sorgho maltées et non maltées ont été traitées par irradiation gamma avec 2 kGy (Ionisos Company, Danieux, France). Après ce traitement, la population de levure résiduelle était inférieure à 10^2 UFC.g⁻¹ et la population de bactéries lactiques était inférieure au seuil de détection de la méthode de comptage sur milieu MRS agar.

2.3.2 Le maltage

Trempage

100 g de grains sont placés dans des paniers cylindriques en grillage métallique de 20 cm de hauteur et 10 cm de diamètre avec une maille de 1 mm et immergés dans un bain-marie à une température de 30°C. Le trempage a été fait avec aération à l'aide d'un bulleur. La durée de trempage est de 15 h, ou de 44 h.

Germination

La germination a été réalisée dans une étuve à 30°C avec une humidité relative de 98%. Après le trempage, les grains sont égouttés et placés dans des barquettes en aluminium déposées dans l'étuve pendant 48 et 72 h respectivement pour les malts obtenus après 44 h et 15 h de trempage.

Séchage

Les grains maltés sont séchés à l'air dans une boucle de séchage réglée à une température de 60°C et 40% d'humidité relative avec un débit d'air de 2 m.s⁻¹ pendant 80 minutes.

Dégermage et broyage

Les radicules sont ôtées manuellement en frottant les grains et sont ensuite éliminées par un tamisage (maille de 2 mm). Le malt dégermé est broyé par un broyeur à disques Laboratory Mill 3100 (Perten Instruments Hagersten, Sweden), la farine est conservée à 4°C.

2.4 Modélisation

2.4.1 Modèles de croissance microbienne

2.4.1.1 Modèle primaire de croissance

Le modèle choisi (équation 30) est celui proposé par Rosso (1995) qui prend en compte une phase de transition entre la phase de croissance exponentielle et la phase stationnaire.

Soit :

$$\begin{cases} \frac{dN}{dt} = 0 & \text{if } t \leq \lambda \\ \frac{dN}{dt} = \mu_{max} \left(1 - \frac{N}{N_{max}}\right) N & \text{if } t > \lambda \end{cases} \quad (30)$$

Avec N la population à l'instant t, N_{max} la population maximale, μ_{max} le taux de croissance maximal et λ la durée de la phase de latence.

2.4.1.2 Modèles secondaires de croissance

Le modèle gamma proposé par Zwietering *et al.* (1993) (équation 31) a été utilisé pour décrire les effets cumulés de la température, du pH, de la concentration en acide lactique non-dissocié ([AH]), de l'éthanol et du glucose sur le taux de croissance.

$$\mu = \mu_{opt} * \gamma(T) * \gamma(pH) * \gamma([AH]) * \gamma([EtOH]) * \gamma([glucose]) \quad (31)$$

avec $\gamma \leq 1$

L'effet du pH sur le μ_{max} a été décrit en utilisant le modèle CPM (équation 32) décrit par (Rosso *et al.*, 1995).

$$CMn(X) = \begin{cases} 0, & X \leq X_{min} \\ \frac{(X-X_{min})^n(X-X_{max})}{(X_{opt}-X_{min})^{n-1}\{(X_{opt}-X_{min})(X-X_{opt})-(X-X_{max})[(n-1)X_{opt}+X_{min}-nX]\}}, & X_{min} < X < X_{max} \\ 0, & X \geq X_{max} \end{cases} \quad (32)$$

Avec X qui correspond aux facteurs environnementaux comme le pH et la température, 'n' est égal à 1 pour les valeurs du pH et 2 pour la température. Les trois paramètres (μ_{opt} , pH_{opt} et $Temp_{opt}$) ont été ajustés en fonction de l'erreur quadratique moyenne la plus basse en utilisant TableCurve 3D, ou en ajustant ces paramètres sous solveur d'Excel. Pour modéliser l'effet du pH sur la croissance des levures le paramètre n du modèle cardinal pour le pH a été ajusté.

Le modèle γ a été utilisé pour prendre en compte l'effet de la matière-première sur la croissance des souches. La valeur $\mu_{max}Ratio$ pour la matière-première (farine de sorgho maltée et non maltée) a été calculée en fonction du ratio entre le taux de croissance maximale spécifique de la matière-première et le taux de croissance spécifique du milieu MRS sur les mêmes conditions de pH (6,5) et de température (37°C) (équation 33) :

$$\mu_{max}Ratio = \frac{\mu_{max}(6.5, 37^{\circ}C)_{MP}}{\mu_{max}(6.5, 37^{\circ}C)_{MRS}} \quad (33)$$

L'effet de l'acide lactique non-dissocié sur la croissance des souches microbiennes a été déterminé en utilisant l'équation (34) selon Coroller *et al.* (2005).

$$\gamma([AH]) = \mu_{max} \left[1 - \left(\frac{[AH]}{CMI} \right)^{\alpha} \right] \quad (34)$$

Avec [AH] la concentration en acide lactique non-dissocié en mM, CMI la concentration minimale inhibitrice en mM de l'acide lactique, μ_{opt} est le taux de croissance dans des conditions optimales de croissance et α reflète la forme de courbes : inférieure à 1, la forme est à la hausse, ce qui représente une sensibilité aux variations des concentrations importantes en acide lactique ; égale à 1, linéaire, une sensibilité constante pour toutes les concentrations

et supérieure à 1 la courbe est descendante, une sensibilité aux faibles variations de concentrations en acide lactique.

Modélisation du temps de latence (λ)

Pour décrire l'effet des facteurs environnementaux comme la température et le pH sur le temps de latence (λ), l'équation (35) selon Charalampopoulos *et al.* (2009) a été utilisée :

$$\mu_{max}\lambda = \alpha + \beta\mu_{max} \quad (35)$$

Modélisation de l'effet de concentration en éthanol

L'effet de l'éthanol sur la croissance microbienne a été déterminé par l'équation (36) proposée par Coroller *et al.*, (2005).

$$\gamma([EtOH]) = \mu_{max} \left[1 - \left(\frac{[EtOH]}{CMI} \right)^\alpha \right] \quad (36)$$

Avec [EtOH] la concentration en éthanol en % V/V, CMI est la concentration minimale inhibitrice de l'éthanol, μ_{opt} le taux de croissance maximal dans des conditions optimales de croissance et α reflète la forme de courbes.

Modélisation de l'effet inhibiteur du glucose sur la croissance de la levure

L'effet de la concentration en glucose sur la croissance des levures a été déterminé par l'équation de Monod modifiée pour tenir compte de l'inhibition par le substrat (équation 37) proposée par (Bai *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008).

$$\mu = \mu_{max} \frac{[S]}{K_s + [S] + \left(\frac{[S]^2}{K_i} \right)} \quad (37)$$

Avec μ le taux de croissance et μ_{max} le taux de croissance maximal, [S] est la concentration en substrat, K_s est la concentration en substrat pour laquelle la valeur de μ est égale à la moitié du μ_{max} et K_i est le terme d'inhibition.

Modélisation de l'effet du glucose sur la croissance des bactéries lactiques

L'effet de la concentration en glucose sur la croissance des bactéries lactiques a été déterminé par l'équation de Monod (équation 38) (Fu et Mathews, 1999; Kelkar et Dolan, 2012; Kim *et al.*, 2016; Lobry, 1991).

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_s + [S]} \quad (38)$$

Avec μ le taux de croissance et μ_{max} le taux de croissance maximal, [S] est la concentration en substrat, K_s est la concentration en substrat pour laquelle la valeur de μ est égale à la moitié du μ_{max} .

2.4.2 Modélisation de la production d'acide lactique et d'éthanol

La cinétique de production d'acide lactique et de l'éthanol sont directement proportionnelles à la croissance bactérienne (équation 39), selon le modèle de Luedeking et Piret (1959).

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/N} \times \frac{dN}{dt} \quad (39)$$

Avec $Y_{P/N}$ le rendement de production d'acide lactique en fonction de la croissance bactérienne N . La concentration en acide lactique P (g.L^{-1}) représente la totalité d'acide lactique produite, sans distinction entre les isomères D et L ou les formes d'acide lactique dissocié et non dissocié.

La cinétique de production d'éthanol est directement proportionnelle à la croissance de la levure (équation 39), où $Y_{P/N}$ est le rendement de production d'éthanol P en fonction de la croissance la levure N .

2.4.3 Modélisation de la valeur du pH de la farine de sorgho en fonction de la concentration en acide lactique

Un modèle semi-mécaniste simple (équation 40) a été utilisé pour prédire la valeur du pH dans la farine de sorgho en fonction de la concentration en acide lactique ($[AL]$, en g.L^{-1}) :

$$pH = pH_{acide} + \frac{pH_{MP} - pH_{acide}}{[AL] \times PT + 1} \quad (40)$$

Avec pH_{acide} , le pH de l'acide lactique dans de l'eau pure, calculé par l'équation de dissociation des acides faibles (équation 41), avec une valeur du pK_a de l'acide lactique de 3,8.

$$pH_{acide} = \frac{1}{2} \times pK_a - \frac{1}{2} \times \log\left(\frac{[AL]}{90}\right) \quad (41)$$

pH_{MP} est le pH de la matière première dans de l'eau, il est calculé par l'équation (42) :

$$pH_{MP} = \alpha \times [MP]^{-p} \quad (42)$$

Pour déterminer les coefficients α et p de cette équation, la farine de sorgho a été dispersée dans de l'eau pure à des concentrations comprises entre 0,04 et 0,4 g.mL^{-1} et le pH a été mesuré. Les coefficients α et p sont calculés par régression linéaire après une transformation en log-log.

PT, est le pouvoir tampon du milieu, il est directement proportionnel à la concentration en matière première [MP] en g.mL^{-1} (équation 43) :

$$PT = \beta \times [MP] \quad (43)$$

Pour déterminer la valeur de β , la farine de sorgho a été dispersée dans de l'eau pure à des concentrations comprise entre 0,04 et 0,4 g.mL^{-1} . Cette suspension a été titrée avec une solution d'acide lactique 0,1 M. Le coefficient β a été déterminé en fonction du pH calculé dans l'équation (40) avec les valeurs de pH mesurées expérimentalement pour chaque concentration de farine de sorgho et en utilisant une régression non-linéaire.

2.4.4 Modélisation de l'activité α -amylasique

L'activité α -amylasique de la farine ionisée a été mesurée à 37°C et à pH 5,5 en utilisant la procédure Megazyme K-Cera 08/05 (Megazyme International, Wicklow, Ireland).

L'effet du pH sur l'activité α -amylasique a été déterminé par l'utilisation du réactif starch Azur (# S7776, Sigma). La procédure K-Cera 08/05 a été utilisée pour l'extraction de l'enzyme. L'extrait a été filtré à l'aide d'un filtre de 0,45 μm de porosité et dilué 4 fois avec du tampon de citrate-phosphate 0,5 M pour avoir une gamme de pH 4 à 7. 1 mL du mélange a été incubé avec 50 mg de Starch Azur à 37°C pendant 1h sous agitation. La réaction a été arrêtée par 0,1 ml d'acide chlorhydrique 4 N. L'absorbance du mélange centrifugé à 7200 g, 1 min a été mesurée à 595 nm.

L'effet de la température sur l'activité α -amylasique a été déterminée en utilisant les tablettes Phadebas (Magle AB, Lund, Sweden). La procédure K-Cera 08/05 a été utilisée pour l'extraction de l'enzyme (200 mg/ 1 mL) et l'extrait a été dilué 50 fois avec le tampon de dilution de la procédure K-Cera 08/05. 200 μL de l'extrait dilué ont été mélangés à 4 mL du tampon de dilution et incubés avec une tablette Phadebas dans un bain-marie à différentes températures (de 25 à 85°C) pendant 15 min. La réaction a été arrêtée par l'addition d'1 ml de NaOH 0,5 M. Le mélange immédiatement vortexé a été centrifugé à 1,500g, 5 min puis l'absorbance du surnageant a été mesurée à 620 nm. L'activité de l' α -amylase a été lue directement sur la courbe standard fournie.

2.4.4.1 Hydrolyse enzymatique de l'amidon

L'hydrolyse de l'amidon soluble a été mesurée dans le tampon de dilution de la procédure K-Cera 08/05 à pH 5,5 et à 37°C sous agitation. L'amidon a été directement mélangé avec le tampon pré-équilibré à 37°C. Une quantité de malt pur ou un mélange de malt et farine de sorgho ou maltose et glucose a été utilisé comme matière-première à des concentrations initiales en substrat comprises entre 12,5 et 300 mg.ml⁻¹. Un échantillon de 1 mL a été prélevé régulièrement pour déterminer la concentration en sucre par HPLC d'après la procédure de Mestres *et al.* (2015). Dans le but de déterminer l'effet de la gélatinisation de l'amidon en fonction de la vitesse d'hydrolyse, 2 g de farine de sorgho ont été précuits pendant 5 min dans le tampon en utilisant un bain marie à différentes températures (68, 73, 80 ou 88°C). Après refroidissement à 37°C, 1 g de malt a été ajouté et l'hydrolyse a été mesurée comme décrit précédemment.

2.4.4.2 Modélisation de l'activité amylasique et de l'hydrolyse de l'amidon

Les effets du pH et de la température sur la V_{max} de l'activité α-amylasique ont été modélisés selon le gamma concept (équation 44) (Zwietering *et al.*, 1993a) en mobilisant le modèle cardinal modifié pour cet effet (équation 45) (Rosso *et al.*, 1995).

$$V_{max} = Vmax_{opt} * \gamma(T) * \gamma(pH) \quad (44)$$

Avec les valeurs de γ comprises entre 0 et 1.

$$CMn(X) = \begin{cases} 0, & X \leq X_{min} \\ \frac{(X-X_{min})^n(X-X_{max})}{(X_{opt}-X_{min})^{n-1}\{(X_{opt}-X_{min})(X-X_{opt})-(X-X_{max})[(n-1)X_{opt}+X_{min}-nX]\}}, & X_{min} < X < X_{max} \\ 0, & X \geq X_{max} \end{cases} \quad (45)$$

Où X représente les facteurs environnementaux (pH ou température) et la valeur de n = 1 pour le pH et n = 2 pour la température.

La vitesse de réaction de l'hydrolyse de l'amidon par l'α-amylase a été décrite par l'équation de Michaelis-Menten avec inhibition compétitive par les produits comme l'ont proposé différents auteurs pour des α-amylases bactériennes (Davis, 2008; Bialas *et al.*, 2014) et pour des α-amylases porcines (équation 46), (Seigner *et al.*, 1985; Warren *et al.*, 2012) ou avec inhibition non-compétitive comme proposé par (Apar et Özbek, 2007; Presečki *et al.*, 2013) (équation 47) :

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{V_{max}S}{S + \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)Km} \quad (46)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{V_{max}S}{Km + \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)S} \quad (47)$$

S est la teneur en amidon (g.L^{-1}), I la concentration de l'inhibiteur, V_{max} la vitesse de réaction maximale ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), Km (g.L^{-1}) la constante de Michaelis-Menten et K_i (g.L^{-1}) la constante de dissociation de l'inhibiteur. Plusieurs travaux ont étudié l'inhibition de l'alpha amylase par les produits de l'hydrolyse de l'amidon, soit le glucose (Davis, 2008; Bialas *et al.*, 2014), le maltose (Warren *et al.*, 2012), le glucose et maltose (Apar et Özbek, 2007; Presečki *et al.*, 2013), ou le maltose et le maltotriose (Seigner *et al.*, 1985). Les amylase semblent avoir plusieurs sites d'inhibition et les constantes d'inhibition varient en fonction des concentrations en inhibiteurs (Seigner *et al.*, 1985). Il est difficile de déterminer les constantes de dissociation des molécules produites et les ratios présentés dans la littérature sont très variables avec des écarts importants. Par prudence, nous avons choisi de prendre la même valeur du K_i , pour le maltose et pour le glucose considérés comme les principaux produits de l'hydrolyse. La quantité non hydrolysée d'amidon (S) à chaque instant est donnée par l'équation (48) :

$$S = S_0 - [\text{maltose}] - [\text{glucose}] \quad (48)$$

S_0 est la concentration initiale en amidon, et [glucose] et [maltose] sont les concentrations en glucose et maltose (g.L^{-1}) à chaque instant.

L'amidon natif (S_n) et l'amidon gélatinisé (S_g) ont été différenciés par DSC selon leur profil de gélatinisation modélisé selon une loi sigmoïde avec une température de mi-gélatinisation de 74°C . Dans ces conditions, seulement une fraction de l'amidon gélatinisé est solubilisée, le reste est associé à des fantômes de grains d'amidon. La fraction soluble est plus rapidement hydrolysée. Ce phénomène a été pris en compte par l'équation (49) qui permet de relier la quantité d'amidon gélatinisé soluble (S_{sol}) qui est proportionnelle à la quantité d'amidon gélatinisé S_g et qui dépend du taux de solubilisation (Sol) de l'amidon gélatinisé.

$$S_{sol} = sol * S_g \quad (49)$$

La fraction complémentaire correspondant à l'amidon resté natif est donnée par l'équation (50) :

$$S_{nat} = S_{nat} + S_{gel} * (1 - sol) \quad (50)$$

L'amidon natif S_{nat} et l'amidon solubilisé S_{sol} ne sont pas hydrolysés à la même vitesse et leur hydrolyse ne conduit pas au même ratio de glucose et de maltose. Des essais nous ont permis

de montrer que lors de l'hydrolyse de l'amidon natif, les quantités de glucose et de maltose produites étaient identiques alors que lors de l'hydrolyse de l'amidon soluble, le maltose représentait 90% des sucres produits. Malgré cela nous avons choisi de considérer que la valeur du K_i était la même pour l'amidon natif et l'amidon soluble.

Le système ordinaire d'équations différentielles (équation 51) qui tient compte de l'inhibition compétitive a permis de déterminer : V_{max}^{nat} , V_{max}^{gel} , K_m^{nat} , K_m^{gel} , K_i et sol , permet la modélisation de l'hydrolyse de l'amidon natif, gélatinisé. Il permet aussi de déterminer les vitesses de production des sucres et les teneurs de glucose et de maltose produites.

$$\begin{aligned} \frac{dS_{nat}}{dt} &= -\frac{V_{max}^{nat}S}{S + \left(1 + \frac{[glucose] + [maltose]}{K_i}\right)K_m^{nat}} \\ \frac{dS_{gel}}{dt} &= -\frac{V_{max}^{gel}S}{S + \left(1 + \frac{[glucose] + [maltose]}{K_i}\right)K_m^{gel}} \\ \frac{d[maltose]}{dt} &= -0.5 \frac{dS_{nat}}{dt} - 0.9 \times \frac{dS_{gel}}{dt} \\ \frac{d[glucose]}{dt} &= -0.5 \frac{dS_{nat}}{dt} - 0.1 \times \frac{dS_{gel}}{dt} \end{aligned} \quad (51)$$

V_{max}^{nat} , V_{max}^{gel} , K_m^{nat} , K_m^{gel} , K_i et sol ont été ajusté de manière itérative selon la procédure de minimisation de Levenberg-Marquardt en utilisant le logiciel Matlab® (The Mathworks Inc., Natick, Mass, USA). Cette méthode est basée sur la minimalisation de la somme du carré des écarts entre la concentration en substrat expérimental ($[X_{exp}]$) et la concentration en substrat calculée ($[X_{pred}]$) pour l'amidon natif et/ou amidon gélatinisé et les produits de la réaction, le glucose et le maltose (équation 52).

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n ([X_{pred}] - [X_{exp}])^2} \quad (52)$$

Où n est le nombre de données.

Pour discriminer les modèles d'inhibition proposés, les sommes des carrés résiduelles (RSS) ont été comparées. Chaque somme est exprimée selon l'équation (53) :

$$RSS = \sum_{i=1}^n ([X_{optipred}] - [X_{exp}])^2 \quad (53)$$

2.5. Méthodes statistiques

Les intervalles de confiance des moyennes (à 95% de probabilité) des régressions linéaires et non-linéaires ont été calculés avec le logiciel XLstat (Addinsoft, Paris).

Les intervalles de confiance de la valeur de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ont été déterminés par la méthode de Levenberg–Marquardt et par l'utilisation de la Macro Bundle selon (De Levie, 2001).

L'écart type pour chacune des valeurs des constantes cinétiques relatives à l'hydrolyse de l'amidon a été déterminé selon la méthode de simulation bootstrapping (Huet *et al.*, 1992).

3 Chapitre 3 : Résultats

3.1 Première partie : Modeling lactic fermentation of gowé using lactobacillus starter culture

3.1.1 Résumé introductif au chapitre

L'objectif de ce travail est de proposer un modèle de la fermentation lactique du gowé capable de prédire la croissance des souches lactiques utilisées et l'évolution du pH du Gowé lors de fermentations conduites à des températures et des taux d'inoculation différents. Deux souches ont été utilisées, fournies par la société Lesaffre (Marcq-en-Barœul, France), soit *L. brevis* (CNCM I-2002) et *L. plantarum* (CNCMI-3069). Le modèle primaire logistique de Rosso a été mobilisé pour déterminer à partir de données acquise lors de cultures en bouillon MRS, la durée de la phase de latence et le taux de croissance maximal ainsi que le niveau de population maximal atteint. La modélisation secondaire qui rend compte de l'impact des paramètres environnementaux sur la croissance des souches lactiques s'est appuyée sur le gamma concept. L'effet de la température et du pH a été modélisé en utilisant le modèle cardinal de température et de pH (CTPM). Les deux souches ont des propriétés différentes. Leurs valeurs optimum de pH et de température sont $8,3 \pm 0,3$, $44,6 \pm 1,2^\circ\text{C}$ et $8,3 \pm 0,3$, $37,1 \pm 3,2^\circ\text{C}$ avec des valeurs de taux de croissance maximal de $1,8 \pm 0,2 \text{ h}^{-1}$ et $1,4 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$ pour *L. brevis* et *L. plantarum* respectivement. L'effet inhibiteur de l'acide lactique non dissocié a été modélisé en utilisant le modèle cardinal d'inhibition. La CMI pour l'acide lactique indissocié est de 23,7 mM pour *L. brevis* et de 35,6 mM pour *L. plantarum*. La production d'acide lactique en fonction de la population est de $2,71 (\pm 0,08) \cdot 10^{-9} \text{ mg.UFC}^{-1}$ pour *L. brevis*, quel que soit le pH. Pour *L. plantarum*, elle est de $11,3 (\pm 0,3) \cdot 10^{-9} \text{ mg.UFC}^{-1}$ quand le pH est supérieur à 5 et de $8,5 (\pm 0,8) \cdot 10^{-9} \text{ mg.UFC}^{-1}$ à pH inférieur à 5. Le rendement de conversion du glucose en acide lactique est proche de 0,8 pour *L. brevis* et de 2 pour *L. plantarum*. Un modèle prenant en compte le pka de l'acide lactique et du pouvoir tampon du milieu, capable de prédire la valeur du pH du mélange malt /farine /eau en fonction de la teneur en acide lactique produit lors de la fermentation a été élaboré. Le taux de croissance maximal optimum dans le mélange eau/farine/malt, à 30°C et à pH 6 de *L. plantarum* ce taux est $1,57 \text{ h}^{-1} (\pm 0,1)$ et de $1,36 \text{ h}^{-1} (\pm 0,1)$ pour *L. brevis*. Ces valeurs sont plus élevées que celles déterminées en bouillon MRS. Le modèle global de la fermentation lactique résultant de l'implémentation en utilisant le logiciel Simulink, de tous les modèles précités a été testé lors de fermentations de gowé à 30°C sans régulation de pH. Les données expérimentales concernant l'évolution de la population de *L. plantarum* s'ajustent bien au modèle, cependant le modèle prédit une durée

de la phase de latence sensiblement plus longue. La prévision de l'acidification du milieu par *L. plantarum* est d'autant meilleure qu'est pris en compte l'effet inhibiteur de l'acide lactique indissocié. Pour *L. brevis*, la confrontation des données prédites et des données expérimentales montre des écarts importants pour la prévision de la population et du pH. L'évolution du pH se fait en deux phases. Une première phase d'acidification lente entre 6h et 15h sans doute liée au développement de souches de levures sauvages présentes dans le malt et la farine de sorgho. Une seconde phase avec une cinétique d'acidification plus rapide liée à la croissance de cette souche qui intervient avec un délai plus court que celui prédit par le modèle. En conclusion, le modèle global de la fermentation lactique a été construit. L'amélioration des prédictions du modèle nécessite de soigner particulièrement la détermination des paramètres cinétiques des deux souches, en particulier celle de la durée de la phase de latence. Néanmoins, le modèle global de la fermentation lactique du gowé issu de ces travaux permet déjà de prédire l'acidité du gowé, en fonction de la souche utilisée, du niveau d'ensemencement et de la température de fermentation. Ce modèle global enrichi des modèles relatifs à l'hydrolyse de l'amidon et à la croissance de souches de levures devrait pouvoir prendre en compte l'ensemble des réactions et des transformations biologiques et ainsi contribuer à la maîtrise de la qualité finale du gowé.

Article

Modeling lactic fermentation of gowé using lactobacillus starter culture

Bettencourt de J. C. Munanga¹, Gérard Loiseau^{2,*}, Joël Grabulos³, Christian Mestres³.

¹ Instituto Superior de Tecnologia Agro-Alimentar de Malanje – ISTAM, EN. 230, Cangambo, Malanje –Angola; kudymwena@yahoo.com.br

² Montpellier SupAgro, UMR Qualisud, Montpellier SupAgro, UMR 95 Qualisud, TA B-95/16, F-34398 Montpellier Cedex 5, France; loiseau@cirad.fr

³ CIRAD, UMR Qualisud TA B-95/16, 73 rue Jean-François Breton, 34398 Montpellier Cedex 5, France ; joel.grabulos@cirad.fr; christian.mestres@cirad.fr

* Correspondence: loiseau@cirad.fr; Tel.: +33-(0)467-615-713

Academic Editor: Régine Talon and Monique Zagorec

Received: 19 September 2016; Accepted: 23 November 2016; Published: 1 December 2016

Abstract: A global model of the lactic fermentation step of gowé was developed by assembling blocks hosting models for bacterial growth, lactic acid production, and the drop of pH during fermentation. Commercial strains of *L. brevis* and of *L. plantarum* were used; theirs growths were modeled using Rosso's primary model and the gamma concept as secondary model. The optimum values of pH and temperature were 8.3 ± 0.3 ; $44.6^\circ\text{C} \pm 1.2$ and 8.3 ± 0.3 , 37.1 ± 3.2 °C with μ_{max} values of 1.8 ± 0.2 and 1.4 ± 0.1 for *L. brevis* and *L. plantarum* respectively. The minimum inhibitory concentration of undissociated lactic acid was 23.7 mM and 35.6 mM for *L. brevis* and *L. plantarum*, respectively. The yield of lactic acid was five time higher for *L. plantarum* than for *L. brevis*, with a yield of glucose conversion to lactic acid close to 2.0 for the former and 0.8 for the latter. A model was developed to predict the pH drop during gowé fermentation. The global model was partially validated during manufacturing of gowé. The global model could be an aid tool in choose of suitable starters and to determine the conditions for the use of the starter.

Keywords: lactic acid bacteria; fermented food; cereal based product; growth; mathematical model.

1. Introduction

Fermentation is one of the oldest methods of preserving food and involves microorganisms whose metabolic activity and growth determine both organoleptic

properties and shelf-life [1]. Most fermented foods consumed worldwide are produced by lactic fermentation from different raw materials such as milk, meat, fish, vegetables, cereals, roots and tubers, with a prominent place for fermented starchy foods: cassava, maize, millet, rice and sorghum, which are an important part of the diet in developing countries [2,3].

In the past, the need to produce fermented foods in large quantities increased in parallel with the advancement of knowledge about the identity of microflora responsible for lactic fermentation. This led to the selection of microbial starters that allowed industrial-scale production of fermented food products of reliable and predictable quality from milk, cereals, and meat. Many of the processes used to prepare traditional fermented foods in developing countries are poorly understood and controlled [4], which limits the ability to produce food of controlled quality at an industrial scale, especially due to the lack of suitable microbial starters [5]. Whatever the context, improving the quality of fermented foods remains an important objective that can be achieved in the case of lactic acid fermentations by using starter cultures that lead to rapid acidification of the raw material used [6]. According to [7], modeling lactic fermentation must include the growth of microbial strains and their functional properties. Modeling can be a valuable tool to help select appropriate strains, design the right equipment, determine the values of the control parameters to ensure greater food security and the quality of end products, and reduce financial losses. For example, modelling the simultaneous effects of fermentation temperature, total solids level of milk and total inoculum level helped to optimize the rheological properties and acidification kinetics of milk fermentation with starter bacteria [8]. In the same way, predictive microbiology helped for the selection of suitable starters for table olive fermentation [9]. Historically, the first models of predictive microbiology were developed to predict the growth of pathogenic bacteria [10]. These models are very useful to describe and simulate the growth of a microbe in environmental conditions. The growth of a population can be modeled using mechanistic or empirical approaches but most models are not entirely one or the other [11].

Empirical models aim for the best fit to the observed data without explaining the phenomena causing the observed response. An example of a widely used empirical model is described in [12]. Mechanistic or semi-mechanistic models are based on knowledge of the biological processes involved, such as the model described in [13]. Predictive microbiology modeling uses primary and secondary models. Primary models, like in the useful logistic growth model proposed by [14], describe changes in the microbial population over time using various parameters such as the initial number of cells, the final number of cells and the maximum growth rate. Secondary models predict changes in the bacterial growth rate as a function of environmental factors such as temperature, pH, water activity (a_w) oxygen tension, etc. In empirical models, the effects of the environmental factors are described simultaneously through a polynomial function or response surface models [15,16]. In the gamma concept, introduced by Zwietering et al. [17] and the cardinal model proposed by Le Marc et al. [18]), each environmental factor acts independently through empirical models, for example, polynomial functions, and their combined effect is multiplicative. In order to better describe and simulate the fermentation process, global models were tentatively built by including equations describing the consumption of substrates, the production of metabolites, changes in the physical and chemical characteristics of the raw material. However, most authors pointed to the difficulty of coping with the increasing complexity of the models and the need for multidisciplinary approach to build complex models that account for the main changes that occur during the fermentation process, while offering user friendly and easily adaptable models [7,19,20].

This paper reports on the first studies in a global project that aims to provide a global but simple model for optimizing batch fermentations such as the fermentation of gowé, a traditional fermented Beninese beverage made from malted and non-malted sorghum flour that is produced by spontaneous fermentation involving mixed cultures of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts [21–23]. The predominant LAB in gowé are *Lactobacillus fermentum*, *Wissella confusa*, *Lactococcus mucosae*,

Pediococcus acidilactici, *Pediococcus pentosaceus* and *Wissella kimchii* [24] and the predominant yeasts are *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia anomala*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* and *Clavispora lusitaniae* [25]. The quality of gowé recognized by consumers is complex: it should have a light and smooth texture, sweet taste, the aroma of a fermented product but low acidity [23–26]. During the process of preparing gowé, amylolysis of starch, which gives the product its lightly sugary taste and its light texture, occurs during the fermentation step, but is rapidly inhibited by acidification caused by the growth of the lactic acid bacteria [27,28]. Controlling fermentation to satisfy consumer demand for quality of gowé is thus very complex, and a modeling approach would be very useful to identify the optimum conditions that meet consumer demand.

The model is designed as an assembly of blocks as proposed by [29]. Each block hosts mathematical equations that model the reactions or processes linked to the fermentation process. In the case of the lactic fermentation of gowé, the main blocks are (Figure 1) the kinetic of lactic acid bacteria growth, the production of lactic acid, the calculation of the pH value, the activity of amylase, and the release of free sugars from starch due to the action of amylase. Undissociated lactic acid and the drop in the pH have a retro-action on both bacterial growth and amylase activity [27]. The temperature influences the whole set of biological reactions.

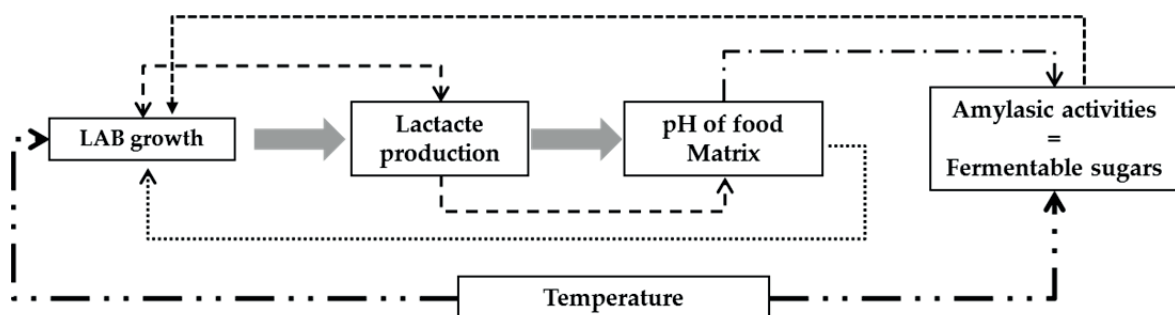


Figure 1: Schematic representation of the global fermentation model of gowé. Each block hosts the model of one process, and interactions are represented by the arrows with dotted lines. LAB: lactic acid bacteria.

In this first study, we focused on the first three blocks linked to LAB growth; starch amylolysis and yeast growth models will be presented in following papers. Growth models of *Lactobacillus brevis* (CNCM I-2002) and *Lactobacillus plantarum* (CNCM I-3069) in De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth were built using Rosso's primary model [30] and the gamma concept for the impact of pH, lactic acid content and temperature. A semi-mechanistic model predicting a drop in the pH of sorghum flour and malt due to acid production was developed and, the predictability of the model was evaluated during gowé fermentation using raw materials decontaminated by irradiation.

2. Materials and Methods

2.1. Raw material

Grains of red sorghum (*Sorghum bicolor*, (Linnaeus) Moench), traditionally used for preparing gowé, were purchased at the local market in Cotonou (Benin). Raw sorghum flour was prepared by directly grinding the grains in a Laboratory Mill 3100 (Perten Instruments, Hagersten, Sweden) equipped with a 0.5 mm sieve. Malting was performed at the laboratory as detailed in [27], and the malted grains were ground in the same way as raw grains.

Malted and non-malted sorghum flours were treated by gamma irradiation with 2 kGy (Ionisos Company, Danieux, France). After this treatment, the residual yeast population was 1.3×10^4 colony forming unit (CFU).g⁻¹ and the residual lactic acid bacteria population was below the threshold of detection (30 CFU.g⁻¹).

2.2 Microbial strains

L. brevis (CNCM I-2002) and *L. plantarum* (CNCMI-3069) were provided by Lesaffre, (Marcq-en-Baroeul, France) as dry active bacteria stored at 4 °C. For all experiments, dry active bacteria were inoculated directly.

2.3 Microbiological methods

2.3.1 Batch cultures

Six-hundred-milliliter glass double wall fermenters with a useful volume of 300 mL without aeration were used. The temperature of the outer jacket was controlled with a thermostatic water bath. Mild but constant homogenization was achieved with a magnetic stirrer. The pH of the media was monitored and automatically adjusted with sterile 1 M sodium hydroxide. Bacterial growth in MRS broth pH 6.4 (Biokar-diagnostics, Beauvais, France) was monitored using an in-line near infrared turbidity sensor (Optek FC20-ASD19-N, Elscolab, Arcueil, France). Cell count was expressed as CFU·mL⁻¹ according to a calibration curve that was pre-established for each strain.

For pilot manufacturing of gowé, the medium was a mixture of 25 g of malted sorghum flour and 75 g of non-malted sorghum flour dispersed in deionized water. One part (15 g) of the non-malted flour was pre-cooked with 75 mL of deionized water at 65 °C for 10 min. When the temperature dropped to 30 °C, the rest of the malt flour, non-malted flour, and 125 mL of demineralized water was added. In this case, the bacterial load was monitored using the plate counting method.

For the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of undissociated lactic acid, tubes containing MRS broth buffered at pH 5 (with 1 M phosphate buffer) and lactic acid concentrations ranging between 0 and 50 mM were inoculated with *L. brevis* or *L. plantarum* at a concentration of 10⁶ CFU·mL⁻¹. The tubes were incubated at 37 °C, and growth was visually evaluated after five days. The final pH was measured, and ranged between 4.7 and 4.8.

2.3.2 Plate counting methods

Tenfold serial dilution of homogenized samples (0.1 mL) was prepared in sterile 9% NaCl water and plated on the surface of De Man Rogosa and Sharpe agar plates (MRS-agar, pH 5.7, Biokar-diagnostics, Beauvais, France) for LAB and on Sabouraud chloramphenicol agar medium (Biokar-diagnostics, Beauvais, France) for yeasts. The

MRS plates were incubated at 37 °C for 48 h. Sabouraud plates were incubated at 30 °C for 48 h.

2.3 Chemical analyses

Lactic acid and glucose contents were measured by HPLC with separation on an Aminex HPX-87H column (Biorad, Hemel Hempstead, UK. and detection with both refractive-index and ultraviolet (UV) (210 nm) detectors. Elution was performed at 30 °C with 5 mM sulfuric acid at a flow rate of 0.6.mL.min⁻¹. Samples were centrifuged at 7200 rpm for 5 min and filtered through 0.45 µm pore size filter before injection.

2.4 Mathematical modeling

2.4.1 Primary and secondary models

The logistic growth model with delay [14] was chosen to describe microbial growth according to Equation (1):

$$\begin{cases} \frac{dNt}{dt} = 0 & \text{if } t \leq \lambda \\ \frac{dNt}{dt} = \mu_{max} Nt \left(1 - \frac{Nt}{N_{max}}\right) & \text{if } t > \lambda \end{cases} \quad (1)$$

where Nt and N_{max} (CFU/mL) are the values of microbial population at time t and at the end of the growth curve, respectively, μ_{max} the maximal growth rate (h⁻¹) and λ the lag time (h).

The gamma concept model [17] was used as secondary model to describe the impact of temperature, pH and the undissociated lactic acid concentration ([AH]) on the maximum growth rate (μ_{max}) according to Equation(2).

$$\mu_{max} = \mu_{opt} * \gamma(T) * \gamma(pH) * \gamma([AH]) \quad (2)$$

with γ values ranging between 0 and 1

The effect of the pH on μ_{max} was expressed using the Cardinal Temperature and pH Model (CTPM) proposed by [30] according to Equation (3).

$$CM_n(X) = \begin{cases} X \leq X_{min}; 0 \\ \frac{(X-X_{min})^n(X-X_{max})}{(X_{opt}-X_{min})^{n-1}\{(X_{opt}-X_{min})(X-X_{opt})-(X-X_{max})[(n-1)X_{opt}+X_{min}-nX]\}} \\ X \geq X_{max}; 0 \end{cases} \quad (3)$$

where X corresponds to environmental factors such as pH, temperature, and n values are 1 for pH and 2 for temperature, respectively.

Temperature and pH minimum cardinal values were determined by surface inoculation of MRS agar medium with drops of pre-cultivated strains on MRS broth at 37 °C for 8 h (achieving an absorbance of 1.4 at 600 nm). For the determination of the minimum pH value, MRS agar broth was buffered with phosphate buffer to achieve a pH ranging from 2.8 to 4, and incubated at 37 °C for 48 h in anaerobic conditions using an anaerobic jar and an Anaerocult kit (MERCK, F-67120, Molsheim, France) to produce CO₂. For the minimum temperature, Petri dishes were incubated at 10 °C and 15 °C for two weeks. The temperature and maximum pH values were determined experimentally on batch cultures.

Optimum cardinal values for pH, temperature and μ_{opt} in MRS broth were adjusted from a set of experiments: with pH ranging from 4.0 to 9.5 at 37 °C and with temperature ranging from 20 °C to 55 °C, at pH 6.5.

The effect of the raw material (sorghum malt and flour dispersion) on μ_{max} was calculated as the ratio of the maximum growth rate in the raw material to the maximum specific growth rate in MRS broth at the same pH (6.5) and temperature (37 °C) as shown in Equation (4).

$$\mu_{max}ratio = \frac{\mu_{max}(6.5, 37^\circ C)_{RM}}{\mu_{max}(6.5, 37^\circ C)_{MRS}} \quad (4)$$

The effect of undissociated lactic acid on bacterial growth was determined using the Equation (5) proposed by [31]:

$$\gamma([AH]) = 1 - \left(\frac{[AH]}{MIC}\right)^\alpha \quad (5)$$

where [AH] represents the undissociated lactic acid concentration in mM, MIC is the minimum inhibitory concentration of the undissociated lactic acid and α reflects

the shape of curves. We applied a value of 1 for α according to [31,32] for Lactobacillus strains.

The lag time (λ) is linked to the adaptation of a strain to a new environment. It is often considered as inversely correlated with μ_{max} [33], and the work to be done by the strain to adapt to a new environment is given by the product $\mu_{max} \cdot \lambda$. Several expressions have been proposed to model this work and we used Equation (6) cited in [34]:

$$\mu_{max} \cdot \lambda = \alpha + \beta \mu_{max} \quad (6)$$

2.4.2 Modeling lactic acid production

The lactic acid content ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) in the model represents total lactic acid production without distinguishing between the D and L isomers, or between dissociated and undissociated lactic acid. The kinetics of lactic acid production was set directly proportional to bacterial growth as shown in Equation (7), as a simplification of Luedeking and Piret equation [29].

$$\frac{d(\text{lactic})}{dt} = Y_{(\text{lactic})/N} \times \mu N \quad (7)$$

where $Y(\text{lactic})/N$ is the yield for lactic acid production over population (without distinction between D and L lactic acid), N , the population and μ is the growth rate.

2.4.3 Modeling the pH value of gowé

A semi-mechanist model (Equation (8)) was used to predict the pH of sorghum flour depending on the lactic acid content of the medium ($[\text{LA}]$, in $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):

$$\text{pH} = \text{pH}_{\text{acid}} + \frac{\text{pH}_{\text{RM}} - \text{pH}_{\text{acid}}}{[\text{LA}] \times \text{BP} + 1} \quad (8)$$

with pH_{acid} , the pH of the lactic acid in pure water which was calculated from the classical dissociation equation of weak acids as shown in Equation (9), with lactic acid pKa of 3.8.

$$pH_{acid} = \frac{1}{2} \times pKa - \frac{1}{2} \times \log\left(\frac{[LA]}{90}\right) \quad (9)$$

with pHRM, the pH of the raw material in pure water which was modeled with a power law equation (Equation (10)) from the sorghum flour concentration, [RM] (g·mL⁻¹):

$$pH_{RM} = \varphi \times [RM]^{-p} \quad (10)$$

To determine the coefficients φ and p of Equation (10), sorghum flour was dispersed in pure water at concentrations ranging from 0.04 to 0.4 g·mL⁻¹ and the pH was measured. The coefficients were calculated by performing a linear regression after log-log transformation.

The buffering power (BP) of the medium was directly proportional to the sorghum flour content (g·mL⁻¹) according to Equation (11):

$$BP = \varepsilon \times [RM] \quad (11)$$

To determine the coefficient ε of Equation (11), sorghum flour was dispersed in pure water at concentrations ranging from 0.04 to 0.4 g·mL⁻¹. The dispersion was then titrated with 0.1 N lactic acid. The ε coefficient was determined by fitting the pH calculated with Equation (8) with the experimental pH for each sorghum flour content using non-linear regression.

2.5 Statistical methods

The confidence intervals of means (at 95% probability) for non-linear and linear regressions were calculated using XLstat (Addinsoft, Paris, France). The cardinal values of Equation (3) were fitted using Tablecurve3Dsoftware (Jandel scientific, San Rafael, CA, USA); the confidence intervals were calculated using the Levenberg–Marquardt method.

3. Results and discussion

3.1 Modeling bacterial growth

The primary logistic model in Equation (1) fits the experimental data well for both strains, as can be seen in Figure 2. Determining the growth rate with great accuracy for each experimental condition is essential for secondary modeling but the residual standard deviations of μ_{\max} were 0.22 h^{-1} for *L. brevis* (five duplicates in similar conditions) and 0.28 h^{-1} for *L. plantarum* (four triplicates in similar conditions), respectively. This may be linked to perturbations of the signal in the case of high bacterial populations (as evidenced in Figure 2), due to cell aggregation and/or CO_2 degassing, in particular for *L. brevis*.

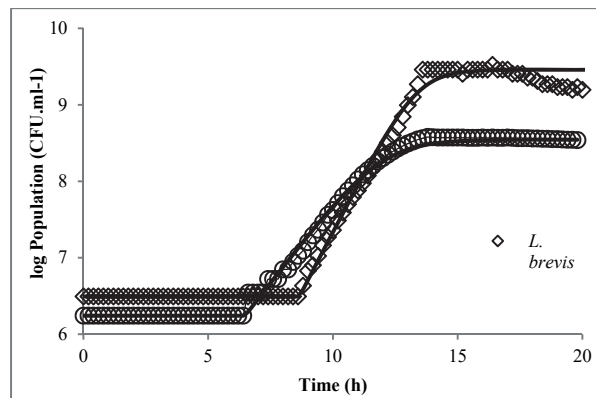


Figure 2. Growth of *Lactobacillus brevis* (\diamond) and *Lactobacillus plantarum* (\circ) in De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth at $37 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 6.5. Experimental data (symbols) and predicted data (continuous lines).

In addition, large standard deviations for λ were observed; 1.6 h and 1.2 h for *L. brevis* and *L. plantarum*, respectively, for the same set of replications. Poor estimates of λ are indeed described in the literature, which can have several explanations [33]. In particular, a low level of inoculation, which was especially true for *L. brevis*, corresponded to the limit of detection of the sensor. Indeed [35] underlined the difficulty in determining λ at low levels of inoculation. Nevertheless, overall trends of the fermentation can be described satisfactorily even when the estimation of the λ is poor [36].

In the whole set of experiments, there was a weak linear correlation ($R^2 = 0.67$ for both strains) between the work for adaptation to the environment ($\lambda \cdot \mu_{\max}$) and μ_{\max} , as shown in Figure 3 for *L. brevis*. The values of the regression parameters of Equation (6) were thus tainted by quite large uncertainties (Table 1). In contrast, [34] found a strong linear correlation between $\lambda \cdot \mu_{\max}$ and μ_{\max} ($R^2 = 0.99$). This discrepancy was largely linked to our poor estimates of experimental λ .

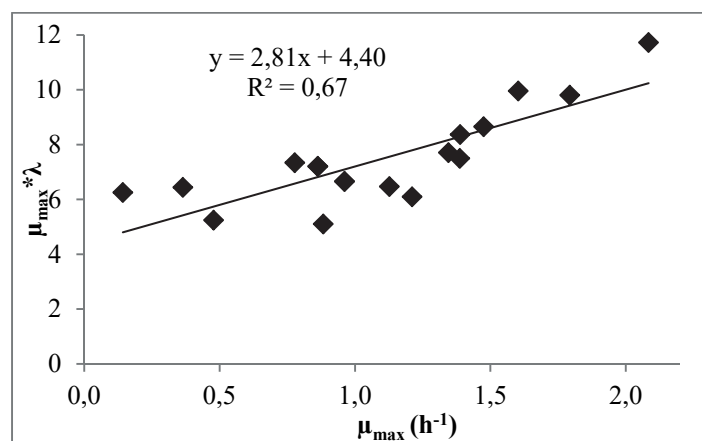


Figure 3. $\mu_{\max} \cdot \lambda$ as a function of μ_{\max} for *L. brevis*.

The kinetic parameters of the two strains are listed in Table 1. The minimum and maximum cardinal values for pH and temperature were determined experimentally, and three parameters were adjusted: μ_{opt} , pH_{opt} and T_{opt} .

Table 1: Parameters of the models of μ_{\max} , lactic acid production rate and pH.

CI = confidence intervals ($\alpha=0.05$).

Modeled variable	Equation	Parameter	Value \pm CI (<i>L. brevis</i>)	Value \pm CI (<i>L. plantarum</i>)
μ_{\max}	(3)	pH_{\min}	3.8	3.2
		pH_{\max}	9.3	9.2
		pH_{opt}	8.3 (± 0.3)	8.3 (± 0.3)
		μ_{opt} (h^{-1})	1.8 (± 0.2)	1.4 (± 0.1)
		T_{\min} ($^{\circ}\text{C}$)	15	12
		T_{\max} ($^{\circ}\text{C}$)	53	52
		T_{opt} ($^{\circ}\text{C}$)	44.6 (± 1.2)	37.1 (± 3.2)
	(4)	μ_{\max} ratio	1.57 (± 0.1)	1.36 (± 0.06)
MIC	(5)	[AH] mM	23.73	35.59

λ	(6)	α	4.4 (± 1.2)	1.7 (± 1.4)
		β	2.8 (± 1.0)	5.6 (± 1.5)
Lactic acid production rate	(7)	Y(lactic)/N (10^{-9} mg.CFU ⁻¹)	2.71 (± 0.08)	11.3 (± 0.3)* 8.5 (± 0.6) [§]
pH _{RM}	(10)	φ	6.30 (± 0.006)	
		ε	0.028 (± 0.003)	
BP	(11)	(mL.g ⁻¹)	0.16 (± 0.02)	

* for pH > 5; § for pH ≤ 5

Although the confidence intervals for these parameters were quite large, the residual error of the predicted μ_{max} was moderate and a quite good fit of the predicted values. This can be observed in Figure 4.

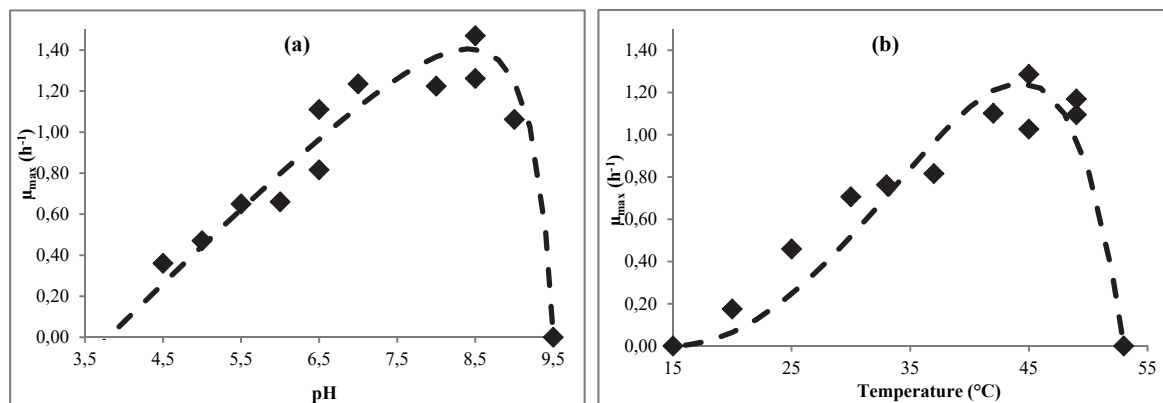


Figure 4. Effect of environment factors on growth rate of *L. brevis*. (a) pH effect and (b) temperature. Experimental data (symbols) and predicted (continuous lines).

The μ_{opt} values calculated with Equation (4) were 1.8 ± 0.2 h⁻¹ and 1.4 ± 0.1 h⁻¹ for *L. brevis* and *L. plantarum*, respectively. The μ_{opt} values determined for the two strains in MRS broth are slightly higher than those cited in literature for *L. plantarum* (0.64 h⁻¹ by [37], and between 1.15 and 1.2 h⁻¹ by [38]) and for *L. brevis* (between 0.9 and 1.4 h⁻¹ by [39] and 0.68 h⁻¹ by [40]).

Cardinal pH_{min} and pH_{max} values for *L. plantarum* are similar to those cited by [41,42,43,44]. However, the optimum pH values in the literature are generally lower than those found in our work. In [41] an optimum pH of 6 for *L. plantarum* was cited, while [39] cited an optimum pH of 5.5 for *L. brevis*. The optimum temperatures

determined in this work are slightly higher than those cited in the literature. In [45,46], optimum temperatures were reported to be between 28 °C and 37 °C for *L. plantarum*, and [47] reported optimum temperatures between 30 °C and 37 °C for *L. brevis*.

Our strains thus evidenced quite original cardinal and optimum values compared with those cited in the literature. *Lactobacillus* strains can indeed present a wide range of genomic and technological properties, as shown for example for *L. plantarum* in red wine [48].

The minimum inhibitory concentration (MIC) of undissociated lactic acid was 35.6 mM and 23.7 mM for *L. plantarum* and *L. brevis*, respectively. In the literature, the MIC of lactic acid are in the same range: [32] reported an MIC value of lactic acid of 53 mM for *L. helveticus*. It should be noted that the MIC of undissociated lactic acid did not perturb the determination of the γ ([pH]). In our conditions, the maximum concentration of lactic acid at or above pH 5 in MRS inoculated with *L. brevis* or *L. plantarum* was of 6–8 mg/mL (Figure 5) which gave a γ ([AH]) of 0.9 for both strains. It was of 0.8 for *L. plantarum* at pH 4, for which the maximum lactic acid concentration was 2 mg/mL. Indeed, these values, which are close to 1, did not really affect the growth rate and hence did not significantly bias the calculation of γ ([pH]) which was, by comparison, 0.41 and 0.31 at pH 5.0 for *L. plantarum* and *L. brevis*, respectively.

3.2 Acid lactic production

The integration of Equation (7) means that the production of lactic acid is directly proportional to the size of the bacterial population. For *L. brevis* (Figure 5a) a constant production ratio of $2.71 (\pm 0.08) \times 10^{-9}$ mg.CFU⁻¹ was found whatever the pH, between 5 and 7. The yield of glucose conversion to lactic acid (M/M) was close to 0.8 M/M at any pH, like the value cited by [49] for obligatory heterofermentative *Lactobacillus*. For *L. plantarum* (Figure 5b), we identified two distinct coefficients depending on the pH. When the pH was over 5, the ratio was $11.3 (\pm 0.3) \times 10^{-9}$ mg.CFU⁻¹, but when the

pH was under 5, the ratio was $8.5 (\pm 0.6) \times 10^{-9}$ mg·CFU⁻¹. The yield of glucose conversion to lactic acid (M/M) was between 2 and 1.5 for *L. plantarum* at pH < 5 and pH > 5, respectively. These results are consistent with homofermentative metabolism [50]. The same effects of pH on lactic acid production and glucose conversion to lactate for *L. plantarum* were described by [51].

The characteristics of each strain are consistent with the common properties of their species. *L. plantarum*, a homolactic fermentative strain, is mesophilic ($T_{opt} = 37.1$ °C), acid tolerant ($pH_{min} = 3.2$) with a minimum inhibitory concentration (MIC) of undissociated lactic acid of 35.6 mM and a yield of glucose conversion to lactic acid (M/M) close to 2. *L. brevis*, a heterolactic fermentative strain, is mesophilic ($T_{opt} = 44.6$ °C), less acid tolerant ($pH_{min} = 3.8$) with a MIC of undissociated lactic acid of 23.7 mM and a yield of glucose conversion to lactic acid (M/M) close to 0.8.

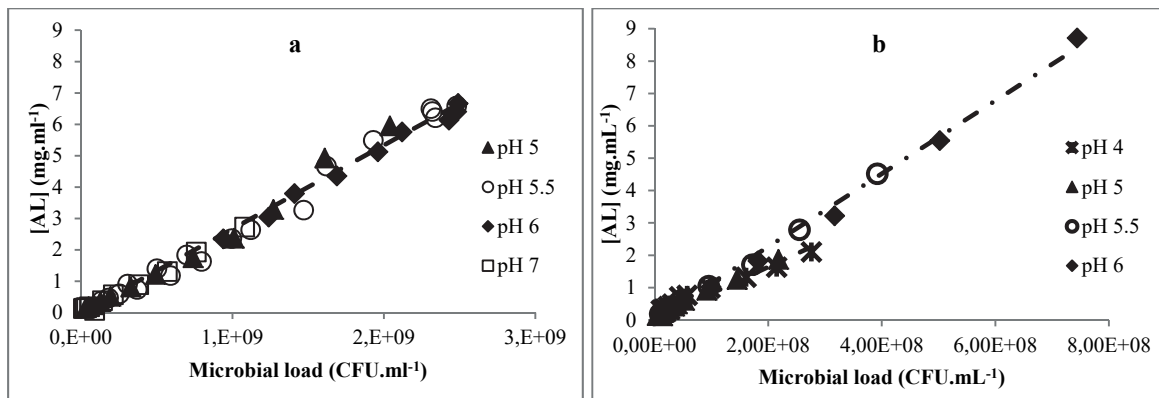


Figure 5. Regression between lactic acid concentration and microbial load for *L. brevis* (a) and *L. plantarum* (b) at pH 4 (*), 5 (▲), 5.5 (○), 6 (◆) and 7 (□).

3.3 Modeling the pH of raw material

The pH of a dispersion of sorghum flour with various amounts of added lactic acid was modeled according to Equation (8) with a coefficient of determination of 0.98. The mean standard error of prediction was 0.17. The predicted pH was indeed very close to the actual pH (Figure 6) for values above 4, while for lower values, the predicted pH was slightly under-estimated.

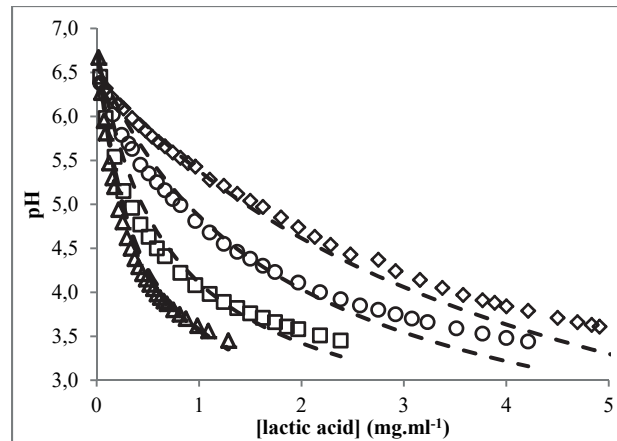


Figure 6. Changes in the experimental (symbols) and predicted (continuous lines) pH of sorghum flour dispersions (\diamond , 0.4 g/mL; \circ , 0.2 g/mL; \square , 0.08 g/mL; \triangle , 0.04 g/mL) with with different lactic acid concentrations.

It was also possible to apply the model when the dispersion of sorghum flour was titrated with sulfuric or acetic acid, leading to a change in Equation (9) by calculating pH for a strong acid or changing the pKa of the weak acid, and calculating the acidity in meq.L^{-1} and expressing ε in mL.meq^{-1} . Without modification of the parameters, the model fit quite well (Figure 7) for strong or weak acid. In addition, it was also possible to use it for a dispersion of sorghum malt by simply taking the initial lactic acid content of the malt into account. This clearly showed that pHRM and BP are quite robust parameters that do not change significantly after malting and that can thus be used for different sorghum flours. Quite similar semi-empirical approaches for predicting the pH of fermenting media have been proposed by [20,34]. The advantage of our model is that provided the initial lactic acid content is known, the pH can be calculated irrespective of the concentration of raw material and with various types of materials (sorghum flours or malts). A model with more extensive applications (wider range of raw materials) could be developed in the future using the approach of [52].

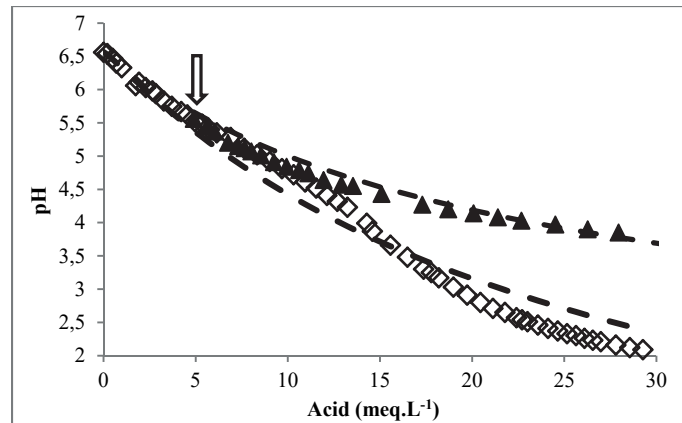


Figure 7: Changes in the experimental (symbols) and predicted (continuous lines) pH of sorghum flour dispersion with the addition of sulfuric acid (\diamond , 2 g/mL) and of malt dispersion with the addition of lactic acid (\blacktriangle , 2 g/mL) (the arrow points to the initial pH of the malt dispersion).

3.4 Validation of the global model

The implementation of the models and the corresponding Equations from (1) to (9), led to a global model that was tested in real conditions during the manufacture of gowé at laboratory scale in conditions close to those of the traditional process. To avoid interactions with the wild microbial flora such as lactic bacteria or yeasts, the raw materials were decontaminated by irradiation. During fermentation, the population of lactic acid bacteria was enumerated by plate counting on MRS agar medium because the turbidity of the suspension of flour and malt indeed prevented the use of an Optek turbidity sensor.

In the first step, we determined the μ_{max} ratio with the raw material. These values are higher than those calculated by the gamma model in MRS broth in the same conditions. This gave a μ_{max} ratio of over 1 for both strains (Table 1). This ratio was thus used as a multiplier to calculate of changes in the population of lactobacilli in the raw material from the model developed in MRS. The free sugar (glucose and maltose) content of the raw material indeed ranged from 20 to 30 g.L⁻¹ throughout the process of fermentation of the raw material, greater than 16 g.L⁻¹ for MRS broth at the beginning of the fermentation and then declined to 0 at the end.

In the second step, we performed the fermentation at 30 °C (close to ambient temperature in Benin), with no control of pH but under gentle agitation. Figure 8 compares the experimental data obtained for the fermentation of the raw material inoculated with each strain with the data predicted by the global model we developed. For the bacterial growth of *L. plantarum* (Figure 8a), the model predicts a lag phase of about 7 h, longer than the experimental lag phase, which was between 4 and 5 h. Nevertheless, it is possible to consider that the models fit the experimental data quite well because the difference between the experimental data and the calculated values is less than 1 log unit, which seems acceptable considering the method of enumeration. An improvement of the model is however necessary to better predict the lag phase, which is indeed tainted by large uncertainties (see above). Figure 8b shows changes in pH during the fermentations of each strain. The model indeed predicted very different behavior for each strain: *L. plantarum*, a homolactic strain, results in much more rapid acidification than *L. brevis*, a heterolactic strain. For *L. plantarum*, the pH predicted by the model fits the experimental pH very well, with only a later start of acidification, due to the prediction of a longer lag phase. It should be noted that when $\gamma([AH])$ was omitted in the model, the predicted pH largely deviated from the experimental pH after 15 h of fermentation. This clearly shows that the concentration of undissociated lactic acid stops bacterial growth, not pH alone. Similarly [32,53,54] demonstrated that the undissociated lactic acid is the main inhibitor of the growth of lactobacilli. However, this effect was much less clear on bacterial growth (Figure 8a) as it is expressed in log values. In the case of *L. brevis*, the model does not fit the experimental data well.

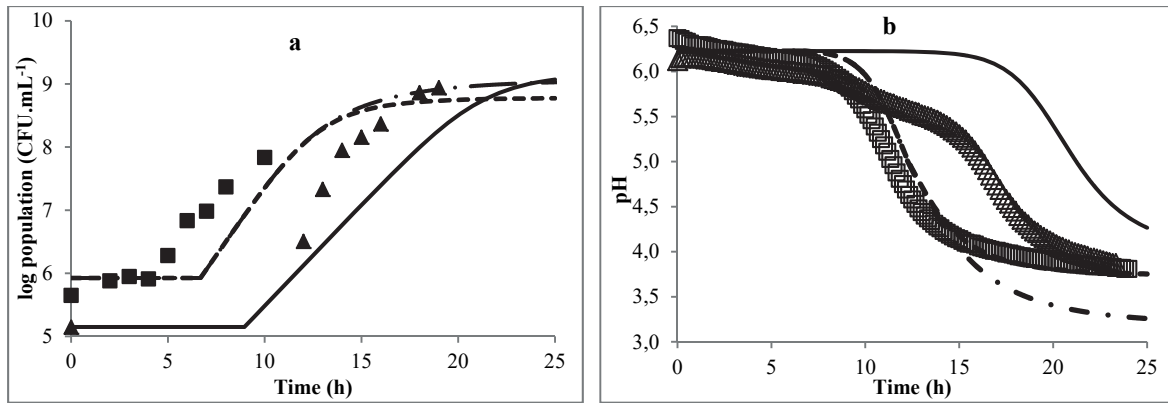


Figure 8: Changes in the log population (a) and in pH (b) for the validation tests. Experimental data for *L. plantarum* (■, □) and *L. brevis* (▲, △). Modeled curves for *L. plantarum* (complete model, ---; model without dissociated lactic acid gamma parameter - · -) and *L. brevis* (complete model, ---; model without dissociated lactic acid gamma parameter, -).

In the experimental data, the pH dropped within two steps. The first drop of pH occurred between 6 and 15 h; it cannot be linked to lactic acid production for maintenance of *L. brevis*, as its level of lactic acid production for maintenance would have to be 10 times higher than that needed for growth in order to explain the observed drop in pH, whereas it is generally 10 times lower [34] and consequently neglected by most authors. This drop may be linked to the growth of yeasts whose residual population was of 1.3×10^4 CFU·g⁻¹ in malted and non-malted irradiated flours i.e., 6.10^3 CFU·mL⁻¹ of gowé. The second drop, linked to the growth of *L. brevis*, was predicted with a delay by the model. This may be linked to overestimation of lag time by the model, like for *L. plantarum*. The difficulty of the model to correctly predict the latent phase is an obstacle that needs to be overcome to improve the quality of the prediction. This will be addressed in particular by improving the accuracy of determination of lag time (increase in the level of inoculation). Nevertheless, the model can already be used to test inoculation (choice of the inoculation strain, level of inoculation) and fermentation conditions (temperature and duration of fermentation) that directly affect the amount of lactic acid and hence the drop in pH, which will directly affect the quality of final gowé. A rapid acidification, after inoculation with homolactic *L. plantarum* will lead to a safer

product, but as the acidification is detrimental to starch amylolysis [28], this will lead to a less sugary product. A global model, integrating models for amylolysis and yeast growth, is thus necessary to define the optimal fermentation conditions for producing safe and appreciated gowé.

5. Conclusions

A global model of the lactic fermentation of gowé was developed on a synthetic medium step by step (block by block) through the implementation of different specific models (blocks) that can predict (i) the kinetics of bacterial growth in different temperature and pH conditions; (ii) the production of lactic acid; (iii) the pH of the medium depending on the concentration of lactic acid; and (iv) the inhibition of the growth of lactic strains due to the concentration of undissociated lactic acid. The global model was used to simulate the behavior of two commercial strains during the fermentation of sorghum flour and malt to produce gowé. Greater attention will be paid in the future to the determination of the kinetic parameters of the two strains, in particular to improve the determination of the lag phase, which should make it possible to improve the performance of the model as a whole.

The global model can already predict the acidity of gowé, but to take into account the sweet taste, which is also a major quality attribute of gowé, the global model can be enriched by adding blocks to model yeast growth and sugar release by amylases whose activity depends on temperature, pH and sugar content.

Acknowledgments: This work was supported by the European funded project, AFTER, Instituto Nacional de Gestão de Bolsas de Estudo (INAGBE), Ministério do Ensino Superior of the República de Angola, French Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD) and Embassy of France in Luanda (Angola). We thank Ennolys/Lesaffre for providing *Lactobacillus plantarum* (CNCM I-3069) and *Lactobacillus brevis* (CNCM I-2002).

Author Contributions: Gérard Loiseau and Christian Mestres contributed protocols, reagents and facilities; Bettencourt de J. C. Munanga, Joël Grabulos and Christian Mestres performed the experiments; Bettencourt de J. C. Munanga, Gérard Loiseau and Christian Mestres

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

References

1. Cocolin, L.; Ercolini, D. *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*; Springer Science & Business Media: New York, NY, USA, 2008. [Google Scholar].
2. Aka, S.; Konan, G.; Fokou, G.; Dje, K.M.; Bonfoh, B. Review on African traditional cereal beverages. *Am. J. Res. Commun.* 2014, 2, 104–153. [Google Scholar]
3. Guyot, J.-P. Cereal-based fermented foods in developing countries: Ancient foods for modern research. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2012, 47, 1109–1114. [Google Scholar] [CrossRef].
4. Achi, O.K. The potential for upgrading traditional fermented foods through biotechnology. *Afr. J. Biotechnol.* 2013, 4, 375–380. [Google Scholar].
5. Holzapfel, W.H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 75, 197–212. [Google Scholar] [CrossRef].
6. Caplice, E.; Fitzgerald, G.F. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, 50, 131–149. [Google Scholar] [CrossRef].
7. Leroy, F.; Degeest, B.; de Vuyst, L. A novel area of predictive modelling: Describing the functionality of beneficial microorganisms in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 73, 251–259. [Google Scholar] [CrossRef].
8. Kristo, E.; Biliaderis, C.G.; Tzanetakis, N. Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using

- response surface methodology. *Food Chem.* 2003, 83, 437–446. [Google Scholar] [CrossRef].
9. Bonatsou, S.; Benítez, A.; Rodríguez-Gómez, F.; Panagou, E.Z.; Arroyo-López, F.N. Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiol.* 2015, 46, 66–73. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
 10. Rosso, L.; Lobry, J.R.; Flandrois, J.P. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J. Theor. Biol.* 1993, 162, 447–463. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
 11. Ferrer, J.; Prats, C.; López, D.; Vives-Rego, J. Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: A SWOT analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 134, 2–8. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
 12. Ratkowsky, D.A.; Lowry, R.K.; Mc Meekin, T.A.; Stokes, A.N.; Chandler, R.E. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.* 1983, 154, 1222–1226. [Google Scholar] [PubMed]
 13. Baranyi, J.; Roberts, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 1994, 23, 277–294. [Google Scholar] [CrossRef].
 14. Rosso, L. *Modélisation et Microbiologie Prévisionnelle: Élaboration d'un Nouvel Outil Pour l'Agro-Alimentaire*; Université Claude Bernard-Lyon I: Lyon, France, 1995. [Google Scholar].
 15. Lebert, I.; Robles-Olvera, A.; Lebert, A. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 61, 27–39. [Google Scholar] [CrossRef].
 16. Watier, D.; Dubourguier, H.C.; Leguerinel, I.; Hornez, J.P. Response surface models to describe the effects of temperature, pH, and ethanol concentration on growth kinetics and fermentation end products of a *Pectinatus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 1233–1237. [Google Scholar] [PubMed].

17. Zwietering, M.H.; Wiltzes, T.; Rombouts, F.M.; van't Riet, K. A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods. *J. Ind. Microbiol.* 1993, 12, 324–329. [Google Scholar] [CrossRef].
18. Le Marc, Y.; Huchet, V.; Bourgeois, C.M.; Guyonnet, J.P.; Mafart, P.; Thuault, D. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 73, 219–237. [Google Scholar] [CrossRef].
19. Degeest, B.; de Vuyst, L. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 2863–2870. [Google Scholar] [PubMed].
20. Vereecken, K.M.; van Impe, J.F. Analysis and practical implementation of a model for combined growth and metabolite production of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 73, 239–250. [Google Scholar] [CrossRef].
21. Michodjèhoun-Mestres, L.; Joseph, H.; Joseph, D.; Christian, M. Physical, chemical and microbiological changes during natural fermentation of “gowé”, a sprouted or non-sprouted sorghum beverage from West-Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 2005, 4, 487–496. [Google Scholar].
22. Vieira-Dalodé, G.; Madodé, Y.E.; Hounhouigan, J.; Jespersen, L.; Jakobsen, M. Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts as inoculum enrichment for the production of gowé, a sour beverage from Benin. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2008, 2, 179–186. [Google Scholar].
23. Adinsi, L.; Vieira-Dalode, G.; Akissoe, N.; Anihouvi, V.; Mestres, C.; Jacobs, A.; Dlamini, N.; Pallet, D.; Hounhouigan, D.J. Processing and quality attributes of gowé: A malted and fermented cereal-based beverage from Benin. *Food Chain.* 2014, 4, 171–183. [Google Scholar].
24. Vieira-Dalodé, G.; Jespersen, L.; Hounhouigan, J.; Moller, P.L.; Nago, C.M.; Jakobsen, M. Lactic acid bacteria and yeasts associated with gowé production

- from sorghum in Bénin. *J. Appl. Microbiol.* 2007, 103, 342–349. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
25. Greppi, A.; Rantisou, K.; Padonou, W.; Hounhouigan, J.; Jespersen, L.; Jakobsen, M.; Cocolin, L. Yeast dynamics during spontaneous fermentation of mawè and tchoukoutou, two traditional products from Benin. *Int. J. Food Microbiol.* 2013, 165, 200–207. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
26. Adinsi, L.; Akissoé, N.H.; Dalodé-Vieira, G.; Anihouvi, V.B.; Fliedel, G.; Mestres, C.; Hounhouigan, J.D. Sensory evaluation and consumer acceptability of a beverage made from malted and fermented cereal: Case of gowé from Benin. *Food Sci. Nutr.* 2015, 3, 1–9. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
27. Mestres, C.; Nguyen, T.C.; Adinsi, L.; Hounhouigan, J.; Fliedel, G.; Loiseau, G. The interaction between starch hydrolysis and acidification kinetic determines the quality of a malted and fermented sorghum beverage. *J. Cereal Sci.* 2015, 63, 8–13. [Google Scholar] [CrossRef].
28. Vieira-Dalodé, G.; Akissoé, N.; Hounhouigan, D.J.; Jakobsen, M.; Mestres, C. Dextrin, sugar and organic acid profiles of spontaneous and modified gowé: A malted and fermented sorghum beverage from Benin. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2015, 50, 549–557. [Google Scholar] [CrossRef].
29. Van Impe, J.; Poschet, F.; Geeraerd, A.; Vereecken, K. Towards a novel class of predictive microbial growth models. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, 100, 97–105. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
30. Rosso, L.; Lobry, J.R.; Bajard, S.; Flandrois, J.P. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 610–616. [Google Scholar] [PubMed].
31. Coroller, L.; Guerrot, V.; Huchet, V.; Lemarc, Y.; Mafart, P.; Sohier, D.; Thuault, D. Modelling the influence of single acid and mixture on bacterial growth. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, 100, 167–178. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].

32. Gätje, G.; Gottschalk, G. Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991, 34, 446–449. [Google Scholar] [CrossRef].
33. Swinnen, I.; Bernaerts, K.; Dens, E.J.J.; Geeraerd, A.H.; van Impe, J.F. Predictive modelling of the microbial lag phase: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 94, 137–159. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
34. Charalampopoulos, D.; Vázquez, J.A.; Pandiella, S.S. Modelling and validation of *Lactobacillus plantarum* fermentations in cereal-based media with different sugar concentrations and buffering capacities. *Biochem. Eng. J.* 2009, 44, 96–105. [Google Scholar] [CrossRef].
35. Augustin, J.-C.; Brouillaud-Delattre, A.; Rosso, L.; Carlier, V. Significance of Inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 1706–1710. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
36. Wijtzes, T.; de Wit, J.C.; Van't, R.; Zwietering, M.H. Modelling bacterial growth of *Lactobacillus curvatus* as a function of acidity and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 2533–2539. [Google Scholar] [PubMed].
37. Liu, B.; Yang, M.; Qi, B.; Chen, X.; Su, Z.; Wan, Y. Optimizing l-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. *Biochem. Eng. J.* 2010, 52, 212–219. [Google Scholar] [CrossRef].
38. Sheeladevi, A. Lactic acid production using lactic acid bacteria under optimized conditions. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* 2011, 2, 6. [Google Scholar].
39. Ogunbanwo, S.T.; Sanni, A.I.; Onilude, A.A. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr. J. Biotechnol.* 2003, 2, 179–184. [Google Scholar].
40. Mihhalevski, A.; Sarand, I.; Viiard, E.; Salumets, A.; Paalme, T. Growth characterization of individual rye sourdough bacteria by isothermal microcalorimetry. *J. Appl. Microbiol.* 2011, 110, 529–540. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].

41. Giraud, E.; Lelong, B.; Raimbault, M. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991, 36, 96–99. [Google Scholar] [CrossRef].
42. Lambert, R.J.W. A new model for the effect of pH on microbial growth: An extension of the Gamma hypothesis. *J. Appl. Microbiol.* 2011, 110, 61–68. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
43. Ogunbanwo, S.T.; Okanlawon, B.M. Influence of nutrients utilization and cultivation conditions on the production of lactic acid by homolactic fermenters. *Biotechnology* 2009, 8, 107–113. [Google Scholar] [CrossRef].
44. Passos, F.V.; Fleming, H.P.; Ollis, D.F.; Hassan, H.M.; Felder, R.M. Modeling the specific growth rate of *Lactobacillus plantarum* in cucumber extract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993, 40, 143–150. [Google Scholar] [CrossRef].
45. Pelinescu, D.-R.; Sasarman, E.; Chifiriuc, M.-C.; Stoica, I.; Nohit, A.-M.; Avram, I.; Serbancea, F.; Dimov, T.V. Isolation and identification of some *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains by a polyphasic taxonomical approach. *Romanian Biotechnol. Lett.* 2009, 14, 4225–4233. [Google Scholar].
46. Zhou, K.; Zeng, Y.; Han, X.; Liu, S. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* BC-25 in response to temperature and pH in batch fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015, 176, 1627–1637. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
47. Dubernet, S.; Desmasures, N.; Guéguen, M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002, 214, 271–275. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
48. Bravo-Ferrada, B.M.; Hollmann, A.; Delfederico, L.; Valdés La Hens, D.; Caballero, A.; Semorile, L. Patagonian red wines: Selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 29, 1537–1549. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].

49. Gottschalk, G. *Bacterial Metabolism*, 2nd ed.; Springer Science & Business Media: New York, NY, USA, 2012. [Google Scholar].
50. Thompson, J.; Gentry-Weeks, C.R. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In *Bacteries lactiques: Aspects Fondamentaux et Technologiques*; de Roissart, H., Luquet, F.M., Eds.; Lorica: Uriage, France, 1994. [Google Scholar].
51. Fu, W.; Mathews, A.P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochem. Eng. J.* 1999, 3, 163–170. [Google Scholar] [CrossRef].
52. Wilson, P.D.G.; Wilson, D.R.; Waspe, C.R. Weak acids: Dissociation in complex buffering systems and partitioning into oils. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 471–476. [Google Scholar] [CrossRef].
53. Gonçalves, L.M.D.; Ramos, A.; Almeida, J.S.; Xavier, A.M.R.B.; Carrondo, M.J.T. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997, 48, 346–350. [Google Scholar].
54. Gadgil, C.J.; Venkatesh, K.V. Structured Model for Batch Culture Growth of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1997, 69, 89–93. [Google Scholar] [CrossRef].



© 2016 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.2 Deuxième partie : Modeling cereal starch hydrolysis during simultaneous saccharification and lactic acid fermentation; case of a sorghum-based fermented beverage, gowé

3.2.1 Résumé introductif au chapitre

L'objectif de ce travail est de modéliser l'hydrolyse de l'amidon qui intervient simultanément avec la fermentation lactique lors de la fabrication du gowé. Ces transformations conduisent à l'obtention d'un gowé peu visqueux, légèrement acide et sucré, des caractéristiques appréciées des consommateurs. L'activité α -amylasique a été modélisée selon le gamma concept en mobilisant le modèle cardinal (CTPM) modifié prenant en compte le pH et la température. A pH 4, l'activité α -amylasique est totalement inhibée. Les valeurs de pH optimum et maximum sont respectivement de 5,3 et 7,5. Les températures, minimale, optimale, et maximale sont respectivement de 15°C, 57,8°C ($\pm 0,8$) et 90°C. Le glucose et le maltose sont les principaux produits d'hydrolyse avec un rendement de conversion de 50%. L'inhibition de l'activité amylasique par le glucose et le maltose a été mise en évidence. Deux systèmes d'équations différentielles ont été testés pour déterminer la nature de cette inhibition. Le meilleur ajustement aux données expérimentales a été obtenu pour le modèle d'inhibition compétitive. La mobilisation de l'équation de Michaelis-Menten reparamétrée selon Ratkowsky (1986) a permis l'estimation des constantes K_m^{nat} et V_m^{nat} , soit respectivement 103g.L⁻¹, 6,82g.L⁻¹.h⁻¹. Ces valeurs ont été fixées pour déterminer la valeur du K_i , soit 14,1g.L⁻¹. Les résultats de suivis de cinétiques d'hydrolyse de l'amidon gélatinisé ont montré qu'à l'inverse le taux de production de maltose augmente avec la température de gélatinisation avec un ratio de maltose/glucose de 9/1 à haute température alors qu'il est de 1/1 pour l'amidon natif. La modélisation d'hydrolyse de l'amidon gélatinisé soluble de la farine précuite a conduit à la détermination des valeurs du K_m^{sol} et de $V_{\text{max}}^{\text{sol}}$ de la fraction soluble de l'amidon gélatinisé, soit 21,97g.L⁻¹ et 81,6g.L⁻¹.h⁻¹. La valeur du K_i étant considérée inchangée. Un modèle global de l'hydrolyse de l'amidon a été construit. La confrontation des données expérimentales aux données calculées a mis en évidence une sous-estimation de la production de glucose et une surestimation de celle du maltose, sans doute liés à une activité glucosidasique du malt non prise en compte dans le modèle. Le modèle global intégrant la modélisation de la fermentation lactique et celle de l'hydrolyse de l'amidon a été testé lors de fabrications de gowé à l'échelle du laboratoire à 25°C, à un taux d'inoculation de 5.10^5 UFC.g⁻¹ de la souche de *L. plantarum* déjà utilisée pour modéliser la fermentation lactique. Concernant l'activité amylasique, les données expérimentales s'ajustent

bien à celles du modèle qui prédit un niveau constant de l'activité amylasique durant les 9 premières heures de la fermentation suivi d'une augmentation pour atteindre un niveau maximum après 15 heures. La perte totale de l'activité intervenant après 21 heures. L'évolution observée des teneurs en glucose et maltose et celle prédite par le modèle suivent la même tendance avec cependant une notable sous-estimation de ces teneurs par le modèle. Trois simulations réalisées avec le modèle global, ont permis de tester 3 scénarios. Le premier étant de précuire la farine à 80°C au lieu de 72°C ce qui augmente le taux de gélatinisation à près de 100%. Dans ces conditions, le modèle prédit seulement l'augmentation de la teneur finale en sucres en relation avec l'augmentation de la quantité d'amidon soluble qui est hydrolysé plus rapidement. Pour le second scénario qui consiste à inoculer dix fois plus de starters, le modèle prédit le raccourcissement de la durée de fermentation de cinq heures sans impacter la quantité finale de sucres. Pour le troisième scénario qui prévoit de réaliser la fermentation à 40°C une température proche de la température optimum de croissance de *L. plantarum*, le modèle prédit à la fois une diminution de 5 heures de la durée de fermentation et le doublement de la teneur finale en sucres. Finalement, il apparaît que la démarche de modélisation pas à pas qui a permis de construire un modèle intégrant la fermentation lactique et l'hydrolyse de l'amidon, en prenant aussi en compte les conditions de précuisson de la farine qui apparaît comme un outil d'optimisation de la fabrication du gowé et d'autres aliments fermentés amylacés.



Modeling cereal starch hydrolysis during simultaneous saccharification and lactic acid fermentation; case of a sorghum-based fermented beverage, gowé

Christian MESTRES^a, Bettencourt de J. C. MUNANGA^b, Gérard LOISEAU^c, Brigitte MATIGNON^a, Joël GRABULOS^a, Nawel ACHIR^c

^aCIRAD, UMR Qualisud TA B-95/16, 73 rue Jean-François Breton, 34398 Montpellier Cedex 5, France

^bInstituto Superior de Tecnologia Agro-Alimentar de Malanje – ISTAM, EN. 230, Cangambo, Malanje, Angola

^cMontpellier SupAgro, UMR Qualisud, Montpellier SupAgro, UMR 95 Qualisud, TA B-95/16, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

ABSTRACT

Gowé is an acidic beverage obtained after simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of sorghum. A previous paper focused on modeling the growth of lactic acid bacteria during gowé processing. This paper focuses on modeling starch amylolysis to build an aggregated SSF model. The activity of α -amylase was modeled as a function of temperature and pH, and the hydrolysis rates of both native and soluble starch were modeled via a Michaelis-Menten equation taking into account the maltose and glucose inhibition constants. The robustness of the parameter estimators was ensured by step by step identification in sets of experiments conducted with different proportions of native and gelatinized starch by modifying the pre-cooking temperature. The aggregated model was validated on experimental data and showed that both the pre-cooking and fermentation parameters, particularly temperature, are significant levers for controlling not only acid and sugar contents but also the expected viscosity of the final product. This generic approach could be used as a tool to optimize the sanitary and sensory quality of fermentation of other starchy products

1. Introduction

Acid fermentation is one of the oldest ways of enhancing the quality of cereal products. It preserves the products, thereby increasing their shelf life, and their nutritional quality while reducing the anti-nutritional compounds they contain. In addition, acid fermentation makes it possible to vary the taste, aroma and texture of cereal products (Blandino *et al.*, 2003; Steinkraus, 1983). A wide range of fermented cereal products exists all over the world today, most of which are traditional products that have not received the necessary scientific scrutiny. These include non-alcoholic but acid and sweet beverages like boza made from millet in Eastern Europe and Turkey, Mahewu from maize in southern Africa (Blandino *et al.*, 2003), and akpan and gowé made from maize and/or sorghum in Benin (Adinsi *et al.*, 2015; Akissoé *et al.*, 2015). An important step in these processes is the hydrolysis of starch during fermentation that provides fermentable sugars for the growth of microflora. Malt is often added to speed up the amylolysis of starch by malt amylases (Dalodé-Vieira *et al.*, 2015; Gadagaet *et al.*, 1999). However, the speed of starch hydrolysis depends on the level of gelatinization, which can be low in gowé, for example (Dalodé-Vieira *et al.*, 2015). In addition, malt amylases are rapidly inhibited by acidification (Mestres *et al.*, 2015) due the growth of *Lactobacilli*.

This type of process, which combines enzymatic hydrolysis of starchy substrates and microbial fermentation of the derived glucose in a single step, belongs to the family of simultaneous saccharification and fermentation processes (SSF). SSF can be much cheaper than successive/separate hydrolysis and fermentation (Wingren *et al.*, 2003) and is applied, for example, in the production of ethanol from lignocellulose (Olofsson *et al.*, 2008) or from starchy food (Ho *et al.*, 2015) or food waste (Davis, 2008), or for production of lactic acid from starchy materials (Hetenyi *et al.*, 2011). The main technical advantage of this process is reduction of the end-product (maltose and glucose) inhibition of the activity of the enzyme due to the simultaneous consumption of the end-product by the fermenting microorganism (Olofsson *et al.*, 2008).

Nevertheless, SSF is a complex all-in-one process; optimum pH and temperature conditions are not the same for amylases and microorganisms. In addition, interactions between amylase end-products (glucose) and the metabolites produced by microorganisms (lactic acid or ethanol, for example) with amylase activity and with microbial growth play a major role in the kinetics of the process. All these effects have to be taken into account and kinetic modeling is an effective way to optimize complex biotechnological processes and to predict performance in a bioreactor (Gonzalez *et al.*, 2016). Numerous models have been developed in particular for the production

of ethanol from starchy materials (Ho *et al.*, 2015; Davis, 2008), but also for the production of lactic acid from wheat flour, (Gonzalez *et al.*, 2016; Hetenyi *et al.*, 2011).

However, a pre-treatment is generally required before SSF, which is a cooking step in the case of starchy material, in order to gelatinize starch and speed-up its amylolysis (Bertoft & Henriksnas, 1982; Lauro *et al.*, 1993). SSF is thus usually applied to soluble starch after complete starch gelatinization (Ho *et al.*, 2015), but sometimes after liquefaction (Gonzalez *et al.*, 2016; Hetenyi *et al.*, 2011) i.e. gelatinization coupled with first starch hydrolysis with thermostable amylases. Many authors have developed empirical or semi-mechanistic models of hydrolysis of native or soluble starch (Galanakis *et al.*, 2015). In the case of Michaelis-Menten models, however, a wide range of parameters is observed (Table 1). The Michaelis-Menten dissociation constant (K_m) between starch and amylases can vary from 0.6 to 15 g/L for malt amylases, from 0.1 to 12.1 for pancreatic and salivary amylases, and from 0.6 to 228 g/L for microbial amylases. In addition, inhibition caused by the reaction products (glucose, maltose and/or maltotriose) is generally taken into account in the case of salivary, pancreatic or microbial amylases but never for malt amylases; a wide range of inhibition dissociation constants is also observed, from 0.8 to 24 g/L for maltose, and from 0.09 to 200 g/L for glucose.

The relative kinetics of the hydrolysis of native or gelatinized starches has rarely been considered in previous studies; when both native and gelatinized starches are present, the hydrolysis of the native starch is generally considered as insignificant compared to that of gelatinized starch (Koljonen *et al.*, 1995). In the case of gowé (Dalodé-Vieira *et al.*, 2015), the hydrolysis of starch during fermentation mainly occurs in the pre-cooked portion of sorghum although it also occurs in the native starch fraction. Most previous models of SSF concern industrial processes at controlled pH. This is not the case in the processing of gowé, during which pH decreases due to acidification caused by the growth of lactic acid bacteria, which inhibits amylase activity (Mestres *et al.*, 2015) and bacterial growth (Munanga *et al.*, 2016).

A previous paper focused on the modeling of lactic acid bacteria growth kinetics during the simultaneous saccharification and fermentation of gowé (Munanga *et al.*, 2016). In order to build an integrated model that describes all the modifications that take place during the SSF of gowé, we added to the previous model the modeling of the activity of α -amylase from sorghum malt under contrasting pH and temperature conditions and took into account the product inhibition factor and the level of gelatinization of starch. The model was then validated in a real SSF of gowé and was used to simulate various conditions.

2. Materials and methods

2.1 Raw material

Grains of red sorghum [*Sorghum bicolor*, L. Moench], traditionally used for preparing gowé, were purchased from the local market in Cotonou (Benin). Raw sorghum flour was prepared by directly grinding the grains in a Laboratory Mill 3100 (Perten Instruments Hagersten, Sweden) equipped with a 0.5 mm sieve. Malting was performed at the laboratory as detailed in Mestres *et al.* (2015) and the malted grains were ground in the same way as raw grains. Malted and unmalted sorghum flours were decontaminated by gamma irradiation as described previously (Munanga *et al.*, 2016); the residual yeast population was less than 10^2 CFU.g⁻¹ and the residual lactic acid bacteria population was below the threshold of detection.

The starch content of the raw sorghum and sorghum malt were 72.3 and 64.6 % (dry basis, db), respectively (determined as per Holm, Björck, Drews, & Asp, 1986). The maltotriose, maltose and glucose contents (determined by HPLC according to de JC Munanga *et al.*, 2016) of the raw sorghum were 0.6, 0.9 and 0.7 % (db), and of the malt, 0.6, 4.6 and 4.1 % (db). Alpha-amylase activity in decontaminated sorghum malt was 33 Ceralpha units/g (see procedure below). The gelatinization profile of the sorghum flour was determined by Differential Scanning Calorimetry according to Vidal *et al.* (2007); the gelatinization peak occurred at 74 °C.

2.2 Microbial strains and gowé fermentation

L. plantarum (CNCMI-3069) was provided by Lesaffre (Marcq-en-Baroeul, France) as dry active bacteria, and stored at 4 °C. Pilot fermentation of gowé was performed in a 600 mL glass double fermenter thermostated at 27.5 °C as described by Munanga *et al.* (2016). Fifteen grams of unmalted flour was pre-cooked with 75 mL deionized water at 72 °C for 10 minutes. When the temperature dropped to 30 °C, 10 g of malt flour, 75 g of unmalted flour, and 125 ml of demineralized water were added. The mixture was poured into the fermenter and inoculated directly with the dry active bacteria at 5×10^5 CFU/g. The pH was continuously monitored with a sterile probe and samples (2 mL) were collected hourly for chemical analysis and to monitor the bacterial load. The latter was performed using the plate counting method as described previously (Munanga *et al.*, 2016).

2.3 Alpha-amylase activity

Alpha-amylase activity in decontaminated malted flour was assessed at 37 °C and a pH of 5.5 using the Megazyme K-Cera 08/05 procedure (Megazyme International, Wicklow, Ireland).

The effect of pH on the activity of alpha-amylase was determined using starch Azur reagent tablets (# S7776, Sigma). The enzyme was extracted as in the K-Cera 08/05 procedure. The extract was then filtered through a 0.45 µm pore size membrane and diluted four times with 0.5 M citrate-phosphate solution buffered to pH ranging from 4.0 to 7.0. One mL of the mixture was then incubated with 50 mg of Starch Azur at 37 °C for 1 h, with periodic agitation. The reaction was stopped with 0.1 ml of 4 M hydrochloric acid. The mixture was centrifuged at 7,200 g for 1 min and the absorbance of the supernatant was measured at 595 nm.

The effect of temperature on alpha-amylase activity was determined using Phadebas amylase tablets (Magle AB, Lund, Sweden). The enzyme was extracted with the extraction buffer using the K-Cera 08/05 procedure (200 mg/ 1 mL) and the extract diluted 10 times with the dilution buffer using the same K-Cera 08/05 procedure. Two hundred microliters of the diluted extract plus 4 mL of the dilution buffer were then incubated with one Phadebas tablet in a water bath thermostated at temperatures ranging from 25 to 85 °C) for 15 min. The reaction was stopped by adding 1 ml of 0.5 M NaOH. The mixture was immediately vortexed then centrifuged at 1,500 g for 5 min and the absorbance of the supernatant was measured at 620 nm. Alpha-amylase activity was then directly read from the provided standard curve.

2.4 Enzymatic hydrolysis of starch

Starch was hydrolyzed in the dilution buffer from the K-Cera 08/05 procedure at pH 5.5 and 37 °C under mild agitation. The starchy sample was directly added to the buffer, which was pre-equilibrated at 37 °C. Pure malt or malt plus sorghum flour or plus maltose and glucose was used as starchy material with an initial substrate concentration ranging from 30 to 300 g/L. Small samples (1 mL) were regularly collected and free sugar content determined by HPLC using the procedure of de Munanga *et al.* (2016). In order to evaluate the effect of the gelatinization of starch on its hydrolysis rate, 2 g of sorghum flour was pre-cooked for 5 min in the buffer in a water bath equilibrated at various temperatures (68, 73, 80 or 88 °C). After cooling to 37 °C, 1 g of malt was added and hydrolysis monitored as described above.

Table 1. Michaelis-Menten modeling of starch α -amylolysis kinetics

α -amylase	Substrate	Hydrolysis condition	Km (g/L)	Ki (g/L)	Parameter determination	Reference
Malted barley (raw)	Gelatinized starch	30°C	0.7	Nc	Progress curve fitting	(Marc., Engasser, Moll & Flayeux, 1983)
Malted finger millet (purified)	Soluble starch	45°C, pH 5.0	5-10	Nc	Lineweaver-Burk plot	(Nirmala & Muralikrishna, 2003)
Malted millet (purified)	Gelatinized starch	60°C, pH 5.0	15.5	Nc	Lineweaver-Burk plot	(Kumar, Singh, & Rao, 2005)
Malted sorghum (purified)	Soluble starch	pH 7.0	5.8	Nc	Lineweaver-Burk plot	Adewale, Agumanu, & Oti-Okoronkwo, 2006
Malted maize (purified)	Soluble starch	-	7.7	Nc	Lineweaver-Burk plot	(Biazus <i>et al.</i> , 2009)
Malted sorghum (purified)	Soluble starch	30°C	1.1	Nc	Non-linear regression	(Adefila, Bakare & Adewale, 2012)
Germinated breadfruit (purified)	Gelatinized cassava starch	pH 6	0.6	Nc	Lineweaver-Burk plot	(Emenike, Chibuzo, & Sabinus, 2015)
Human salivary/pancreatic	Maltoheptaose	37°C, pH 7.0	6.8/12.1	Nc	Lineweaver-Burk plot	(Saito, Horiuchi, Yoshida & Imai, 1979)
Human salivary/pancreatic	Carboxymethyl starch	37°C, pH 6.9	0.1/0.16	Nc	Lineweaver-Burk plot	(Satomura <i>et al.</i> , 1984)
Porcine pancreatic	Amylose	30°C, pH 7.2	-	Maltose: 4-15 (c) Maltotriose: 0.07-0.14 (c)	Hill and Lineweaver-Burk plots	(Seigner, Prodanov & Marchis-Mouren, 1985)
Porcine pancreatic	Maize starch	-	0.26	Maltose: 3.5 (c)	Dixon plot	(Warren, Butterworth & Ellis, 2012)
Microbial	Soluble starch	32°C, pH 4.8	1.4	Glucose: 1.9 (c)	Lineweaver-Burk plot	(Steverson, Korus, Admassu, & Heimsch, 1984)
Microbial	Starch	100°C, pH 7.0	59	Nc	Lineweaver-Burk plot	(Yankov, Dobрева, Beschkov, & Emanuilova, 1986)
Microbial	Gelatinized potato starch	32°C, pH 5.0	0.6	Glucose: 2.0 (c)	Lineweaver-Burk plot	(Pasari, Korus, & Heimsch, 1988)
Microbial	Native soluble starches	60°C	1.4-6	Ns	Lineweaver-Burk plot	(Heitmann., Wenzig & Mersmann, 1997)
Microbial	Native rice-maize starches	50°C	9-13	Nc	Lineweaver-Burk plot	(Konsula & Liakopoulou-Kyriakides, 2004)
Microbial (Stargen©)	Food waste	27°C	27	Maltose: 0.8 (c)	Progress curve fitting	(Davis, 2007)
Microbial	Soluble starch	60°C, pH 7.0	8.3	Nc	Lineweaver-Burk plot	(Ikram-Ul-Haq, Javed, & Hameed, 2010)
Microbial (Stargen©)	Native maize flour	35°C	27	Glucose: 0.09 (c)	Progress curve fitting	(Bialas, Czerniak & Szymanowska-Powalowska, 2014)
Microbial (themamyl-liquozym)	Maize starch	65°C, pH 5.5	8.5	Glucose: 35-200 (u) Maltose: 14-24 (u)	Lineweaver-Burk plot	(Presečki, Findrik & Vasic-Racki, 2013)
Microbial	Starch	-	228	Glucose: 24 (u) Maltose: 8 (u)	Lineweaver-Burk plot	(Apar & Özbek, 2007)

2.5. Modeling fermentation, α -amylase activity and starch hydrolysis

The growth of lactic acid bacteria was modeled using the logistic growth model with delay as primary model, the gamma concept (Zwietering *et al.*, 1993) and the cardinal model (CPTM) for pH and temperature (Rosso *et al.*, 1995) as described previously (Munanga *et al.*, 2016). The previously mentioned parameters of the lactic acid production by lactic acid bacteria and its effect on the pH were also used. In a similar approach, the effects of pH and temperature on the V_{max} of α -amylase activity were modeled using the gamma concept and the cardinal model (equations 1 & 2):

$$V_{max} = V_{max}^{opt} * \gamma(T) * \gamma(pH) \quad (1)$$

with γ values ranging between 0 and 1

$$\gamma_n(X) = \begin{cases} X \leq X_{min}; 0 \\ \frac{(X - X_{min})^n (X - X_{max})}{(X_{opt} - X_{min})^{n-1} \{(X_{opt} - X_{min})(X - X_{opt}) - (X - X_{max})[(n-1)X_{opt} + X_{min} - nX]\}} \\ X \geq X_{max}; 0 \end{cases} \quad (2)$$

where X corresponds to environment factors (pH or temperature) and a n value of 1 for pH and of 2 for temperature, respectively.

The reaction rate of starch hydrolysis by α -amylase was described using the Michaelis-Menten equation with competitive inhibition by the products, as in numerous papers on microbial (Bialas *et al.*, 2014; Davis, 2008) and porcine (Seigner, Prodanov, & Marchis-Mouren, 1985; Warren, Butterworth, & Ellis, 2012) α -amylases (Eq. 3) or with uncompetitive inhibition, as proposed by (Apar & Özbek, 2007) and (Presečki, Findrik, & Vasic-Racki, 2013) (Eq. 4):

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{V_{max} S}{S + \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) K_m} \quad (3)$$

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{V_{max} S}{K_m + \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) S} \quad (4)$$

where S is starch concentration (g/L), I is the concentration of the inhibitor, V_{max} the maximum reaction rate (g/L/h), K_m (g/L), the Michaelis-Menten constant and K_i (g/L), the dissociation constant of the inhibitor.

Numerous papers indeed deal with the inhibition of amylase by product molecules: glucose (Bialas *et al.*, 2014; Davis, 2008), maltose (Warren *et al.*, 2012), glucose and maltose (Apar & Özbek, 2007) and (Presečki *et al.*, 2013), or maltose and maltotriose (Seigner *et al.*, 1985). Amylases appear to have several inhibition sites and the inhibition constants vary with the

concentration of the inhibitors (Seigner *et al.*, 1985). The dissociation constants of the product molecules are thus difficult to determine and their relative ratio varies considerably in the literature. In order to be more conservative, we chose to set only one unique inhibition constant (K_i) for maltose and glucose. Indeed, a more comprehensive model that takes into account the different inhibition constants would have increase the numbers of fitting parameters yielding an unstable model.

Maltose and glucose were considered to be the main hydrolysis products and residual starch content during hydrolysis (S) was calculated by difference according to eq.5:

$$S = S_0 - [\text{maltose}] - [\text{glucose}] \quad (5)$$

where S_0 is the initial starch concentration, and [glucose] and [maltose] are glucose and maltose concentrations (g/L) during hydrolysis. Native (S_n) and gelatinized starches (S_g) were differentiated by DSC from the gelatinization profile modeled by a sigmoid law with a mid-gelatinization temperature of 74 °C. Starch is partially solubilized after gelatinization while the other portion remains embedded in granule ghosts. The soluble part is more rapidly hydrolyzed than the ghost remnants. This phenomenon was taken into account by defining the soluble gelatinized (S_{sol}) proportional to the amount of gelatinized starch with sol being the solubilization fraction:

$$S_{sol_0} = sol * S_{g_0} \quad (6)$$

The apparent initial native (S_{nat}) was the complementary according to Eq. 7:

$$S_{nat_0} = S_n + S_g * (1 - sol) \quad (7)$$

S_{nat} and S_{sol} were not hydrolyzed at the same velocity and did not produce the same proportions of product. In the case of native starch, our experiments showed that maltose and glucose were produced in the same quantities while maltose represented 90% of the degraded soluble starch. However, K_i was considered to be similar for the hydrolysis of native and soluble starch.

Finally, the system of ordinary differential equation used to solve in the case of competitive inhibition was (Eq. 8):

$$\begin{aligned} \frac{dS_{nat}}{dt} &= - \frac{V_{max}^{nat} S}{S + \left(1 + \frac{[\text{glucose}] + [\text{maltose}]}{K_i}\right) K_m^{nat}} \\ \frac{dS_{sol}}{dt} &= - \frac{V_{max}^{sol} S}{S + \left(1 + \frac{[\text{glucose}] + [\text{maltose}]}{K_i}\right) K_m^{sol}} \\ \frac{d[\text{maltose}]}{dt} &= -0.5 \frac{dS_{nat}}{dt} - 0.9 \times \frac{dS_{sol}}{dt} \\ \frac{d[\text{glucose}]}{dt} &= -0.5 \frac{dS_{nat}}{dt} - 0.1 \times \frac{dS_{sol}}{dt} \end{aligned} \quad (8)$$

V_{max}^{nat} , V_{max}^{sol} , K_m^{nat} , K_m^{sol} , K_i and sol were iteratively adjusted to the goodness of fit merit function with the Levenberg-Marquardt minimization procedure using the Matlab[®] software (The Mathworks Inc., Natick, Mass, USA). This merit function is the root mean of square error (*RMSE*) between experimental ($[X_{exp}]$) and calculated ($[X_{pred}]$) concentrations of both substrate (starch, native and/or gelatinized) and reaction products (i.e. glucose and maltose) (eq. 9).

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n ([X_{pred}] - [X_{exp}])^2} \quad (9)$$

where n is the number of data.

To discriminate the proposed models, the Residual Sum of Square (RSS) were compared. The residual sum of squares is expressed according to eq. 9.

$$RSS = \sum_{i=1}^n ([X_{optipred}] - [X_{exp}])^2 \quad (10)$$

The standard deviations on identified rate constants were determined using bootstrapping simulations (Huet *et al.*, 1992). The principle is the generation of a large number (500) of resamples of the observed dataset (and the same size as the observed dataset) added with a Gaussian perturbation within the experimental standard deviation as follows (Eq.10):

$$[\tilde{X}] = [X_{exp}] + U_x \delta \quad (11)$$

with $[\tilde{X}]$, the virtual data generated, $[X_{exp}]$, the real measured value, U_x , the estimated error on measured value, δ , a random number whose elements are normally distributed with mean 0 and variance 1. These virtual data were generated with Matlab[®] software (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA).

For a given operating condition, $m = 500$ sets of data were randomly drawn using adequate equation(s) and m values of parameters to be determined were identified as described above on m separate sets of data. The mean and standard deviation were estimated for each constant rate from the m values.

2.6 Statistical analyses

The data confidence intervals of the averages (at 95% probability) of the non-linear regressions were calculated using the macro bundle according to De Levie (2001).

3. Results and discussion

3.1 Modeling the effect of pH on α -amylase activity

The activity of α -amylase was measured at pH ranging from 4 to 7 (Figure 1a). Its profile depicted a classical reversed U-curve with complete inhibition at pH 4. This result is consistent with our previous results (Mestres *et al.*, 2015) showing that at the end of the fermentation of gowé, when the pH is below 4, α -amylase activity is completely lost. Similarly, Nirmala and Muralikrishna (2003) argued that malt α -amylase is stable at a pH ranging from 5 to 9 but at a pH below 4 its activity slows down until total inhibition. In order to be consistent with the models developed for bacterial growth (Munanga *et al.*, 2016) and because the (cardinal) parameters of this model are meaningful, the α -amylase activity was modeled using the CTPM model. Using this model, the optimum and maximum pH were fitted to 5.3 and 7.5, respectively (Table 2). Very similar results were obtained by Ba (2013) and Egwim and Oloyede (2006), who reported optimum pH for α -amylase activity from sprouting sorghum of 5.5 and 5.6, respectively. Maktouf (2013) reported an optimum pH of 5 for millet α -amylase and Nirmala and Muralikrishna (2003) reported that the optimum pH for the activity of α -amylases from various cereals ranged between 5.0 and 5.5, depending on the different isoenzymes.

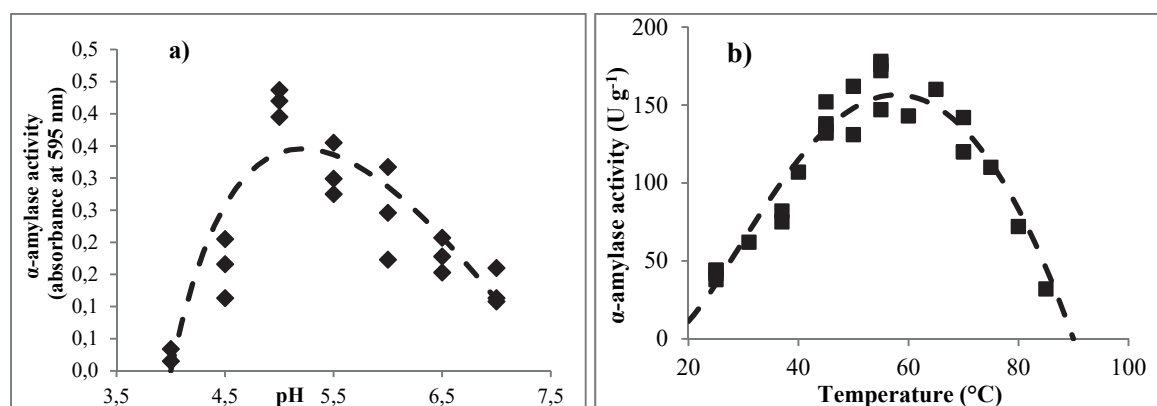


Fig. 1 Effect of environment factors on amylase activity experimental (black symbols) and predicted (dash lines) a) effect of pH and b) effect of temperature

Table 2. Parameter values for the amylolysis model

Parameter	Value
pH_{\min}	4.0

pH_{max}	7.5
pH_{opt}	5.3 (0.1)*
T_{min} (°C)	15
T_{max} (°C)	90
T_{opt} (°C)	57.8 (0.8)*
$V_{\text{max}}^{\text{nat}}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	6.82 (0.30) [§]
K_m^{nat} (g.L ⁻¹)	103.6 (4.1) [§]
K_i (g.L ⁻¹)	14.1 (1.3) [§]
S_{ol}	0.60 (0.02) [§]
$V_{\text{max}}^{\text{sol}}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	81.6 (14.5) [§]
K_m^{sol} (g.L ⁻¹)	21.97 (0.91) [§]

* Means and standard deviations (in brackets) were obtained by non-linear regressions using the Macro Bundle

[§] Means and standard deviations (in brackets) of 500 values were obtained by bootstrapping.

3.2 Modeling the effect of temperature on α -amylase activity

The activity of malt α -amylase was monitored at different temperatures (from 25 to 85 °C) thanks to a cross-linked starch reagent that retains its native form even at 100 °C. Therefore, there was no effect of temperature on the substrate in the experimental domain that could have biased the results (Figure 1b). To model the effect of temperature on α -amylase activity, the CTPM model was used again. The minimum, maximum and optimum temperatures for α -amylase activity were 15 °C, 90 °C and 57.8±0.8 °C respectively (Table 2). Adefila *et al.* (2012) reported that the optimum temperature for α -amylase activity from malted sorghum was around 60 °C, whereas it was between 47°C and 51°C for millet α -amylase (Nirmala & Muralikrishna, 2003).

In addition to optimum temperature, thermal stability is an important parameter to take into account in the use of α -amylase in different industrial processes. According to Ba (2013), more than 90% of sorghum α -amylase activity was retained after 1 hour at 65 °C but the activity decreased markedly when the temperature reached 75 °C. Kumar *et al.* (2005) studied the thermal stability of α -amylases from sorghum malt and observed that 70% of the activity was lost after 15 min at 70 °C. Thermal stability is thus a critical phenomenon in the case of mashing for example, during which cooking and amylolysis occur simultaneously (Brandam *et al.*, 2003; Koljonen *et al.*, 1995; Marc *et al.*, 1983) at relatively high temperatures (65-75 °C). However, this is not taken into account in the present study, as the pre-cooking step was

performed on sorghum flour and malt was added during the simultaneous saccharification and fermentation process, i.e. at moderate temperature (25-40 °C).

Another phenomenon that has to be taken into account, however, is the impact of starch gelatinization on the speed of amylolysis. In the previous studies, the speed of hydrolysis of the native starch was generally considered insignificant compared to that of gelatinized starch (Koljonen *et al.*, 1995)., This will be addressed in the following sections.

3.3 Hydrolysis kinetics of native sorghum starch and its modeling

Hydrolysis runs were carried out with a constant native malt quantity, but with different quantities of sorghum flours (proportions of native malt and sorghum flours were of 1/0, 1/1, 1/2, 1/3 and 1/5) leading to initial native starch content of 30, 70, 100, 140 and 200 g/L, respectively, but with constant amylase activity. The symbols in figure 2a-e show the experimental starch hydrolysis and sugar production kinetics. The decrease in starch appeared to be almost linear over time when the initial substrate level was low (30-70 g.L⁻¹) and became non-linear at higher concentrations (100-200 g.L⁻¹). The initial rate of hydrolysis, calculated by linear regression for the 3-4 hours of hydrolysis, increased from 1.4 g.L⁻¹.h⁻¹ at the lowest initial substrate level (30 g.L⁻¹) to 4.5 g.L⁻¹.h⁻¹ at the highest substrate level (200 g.L⁻¹); it thus increased 3-fold when the substrate content increased 6-7-fold. Depending on the origin of α -amylase, the degradation of raw starch can lead to pure glucose, or with the addition of malto-oligosaccharides (Tawil *et al.*, 2012). In our case, glucose and maltose were the main hydrolysis products and were released at the same conversion yield of 50%, while the level of maltotriose (not shown) was very low. Glucose and maltose are known to inhibit the activity of malt α -amylase on native starch (Hill *et al.*, 1997). We thus tested the effect of increasing initial concentrations of maltose and glucose (5, 15 and 30 g.L⁻¹) on the starch hydrolysis rate (Figure 2a). The results clearly showed a decrease in the hydrolysis rate at the highest concentrations of maltose and glucose.

To gain insight into the inhibition mechanisms, two hypotheses, one for competitive and the other for uncompetitive inhibition (eq. 3 and 4 respectively) proposed in the literature (Table 1), were tested. Two systems of three ordinary differential equations (eq. 7) for native starch hydrolysis and for glucose and maltose production were built and solved for the two hypotheses proposed. The resulting root mean square deviations were 28.7 and 30.6, respectively. Therefore, the best fit (for both starch hydrolysis and sugar release) was obtained for competitive inhibition by the products. This is in agreement with the majority of starch

hydrolysis studies (Table 1). The enzymatic kinetic parameters for native starch V_{max}^{nat} , K_m^{nat} , and K_i , were identified in two steps. Indeed, because Michaelis-Menten is a non-linear model, appropriate initial estimation of the parameters is required to get real solutions. A first estimation of V_{max} and K_m was thus made using the experimental data obtained with high concentrations of native starch (100 to 200 g/L) and with low sugar yield < 30% (w/w) to minimize and ignore the inhibition effect. A reparametrized Michaelis-Menten equation was used according to (eq. 12). Indeed, according to (Ratkowsky, 1986), putting the parameters in the denominator is the best way to obtain a close-to-linear model and unbiased and minimum-variance estimators of the parameters:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{S}{\theta_1 S + \theta_2} \quad (12)$$

where θ_1 is $1/V_{max}$ and θ_2 , K_m/V_{max} .

The two parameters K_m^{nat} and V_{max}^{nat} obtained with this strategy were thus set then K_i was adjusted for all the sets of experiments, including lower native starch concentration and higher conversion yield and with the addition of glucose and maltose. Predicted values were quite close to the experimental data whatever the initial conditions (Figures 2, solid lines) The three resulting K_m^{nat} , V_{max}^{nat} , and K_i parameters are detailed in table 2.

Very few studies have been published on modeling raw starch hydrolysis by malt amylase, which is indeed often considered to be negligible, for example, during mashing (Koljonen *et al.*, 1995). The K_m value we found in our experiments on native starch was much higher than that found for gelatinized or soluble starch with malt amylases ($K_m = 0.6$ to 15 g/L) and 4-fold higher than that found with bacterial α -amylase on native starch (27 g.L⁻¹) (table 1). We found no values of K_i in the literature with our conditions, i.e., native starch hydrolyzed by malt amylase.

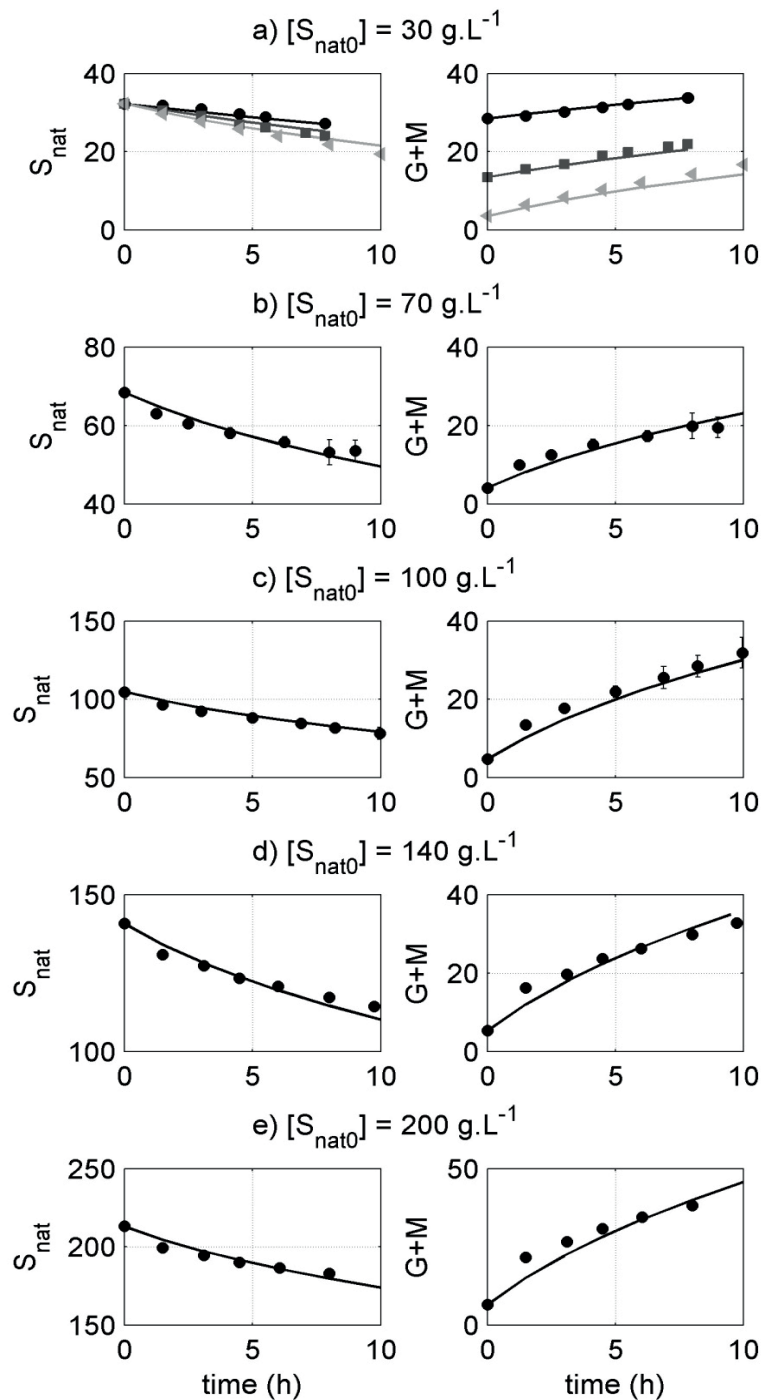


Fig. 2. Changes in concentrations of native starch (S_{nat}) and sugar release -glucose (G) and maltose (M)- during hydrolysis at 37 °C of different proportions of native malt and sorghum flour (g/g) of 1/0, 1/1, 1/2, 1/3 and 1/5 from a) to e) respectively and different initial concentrations of maltose and glucose in a) 5 (\blacktriangleright), 15 (\blacksquare) and 30(\bullet) g.L⁻¹. Experimental and modeled data are presented in symbols and solid line respectively.

3.4 Hydrolysis kinetics of native and soluble gelatinized sorghum starch and its modeling

The effect of partial and increasing starch gelatinization on the kinetics of starch hydrolysis by malt amylases was then monitored. The proportion of native malt and pre-cooked sorghum was fixed at 1/2 (g/g) but the pre-cooking was performed at 35, 68, 73, 80 or 88 °C. The resulting initial concentrations of native/gelatinized starch differentiated by DSC in malt and pre-cooked mixtures were calculated as 104/0, 101/3, 78/26, 38/66, and 35/69 g.L⁻¹, respectively.

Figure 3c shows that, the hydrolysis rate at 37 °C increased dramatically with an increase in the initial concentration of gelatinized starch, i.e. when the cooking temperature of the flour was increased up to 80-88°C prior to amylolysis. Indeed, the initial hydrolysis rate increased 6-fold, from 4 g.L⁻¹.h⁻¹ to 23, when the pre-cooking temperature was raised from 35 to 88 °C. The increase in the rate was non-linear as a function of temperature with a marked increase between 73 and 80 °C, in parallel with the gelatinization level. Regarding the release of sugar, the rate of glucose production was nearly linear and did not change substantially as a function of the proportion of gelatinized starch, with an average rate of 2 g.L⁻¹.h⁻¹ (Figure 3d). In contrast, the rate of maltose production increased non-linearly as a function of the temperature with the same trend as for the starch hydrolysis rate. Indeed, the initial rate of maltose production increased 11 fold from 2 to 22 g.L⁻¹.h⁻¹ when the pre-cooking temperature was raised from 35 to 88 °C. These results prompt two conclusions: qualitatively, maltose production increases as a function of the initial gelatinized starch content, and quantitatively, the maltose: glucose production ratio is about 9:1 for gelatinized starch while it is 1:1 for native starch. This is consistent with the literature, in which maltose is reported to be the main fermenting sugar in barley and sorghum malt worts, i.e. when starch is gelatinized during amylolysis; maltose content is four to 10 times higher than that of glucose and maltotriose (Taylor, 1994; Brandam *et al.*, 2003; Koljonen *et al.*, 1995; Marc *et al.*, 1983). Taylor (1994) clearly pointed out the role of malt gluco-amylase in the ratio of maltose to glucose of wort; when the malt is completely gelatinized during mashing, the ratio increased due to the inactivation of gluco-amylase at the gelatinization temperature.

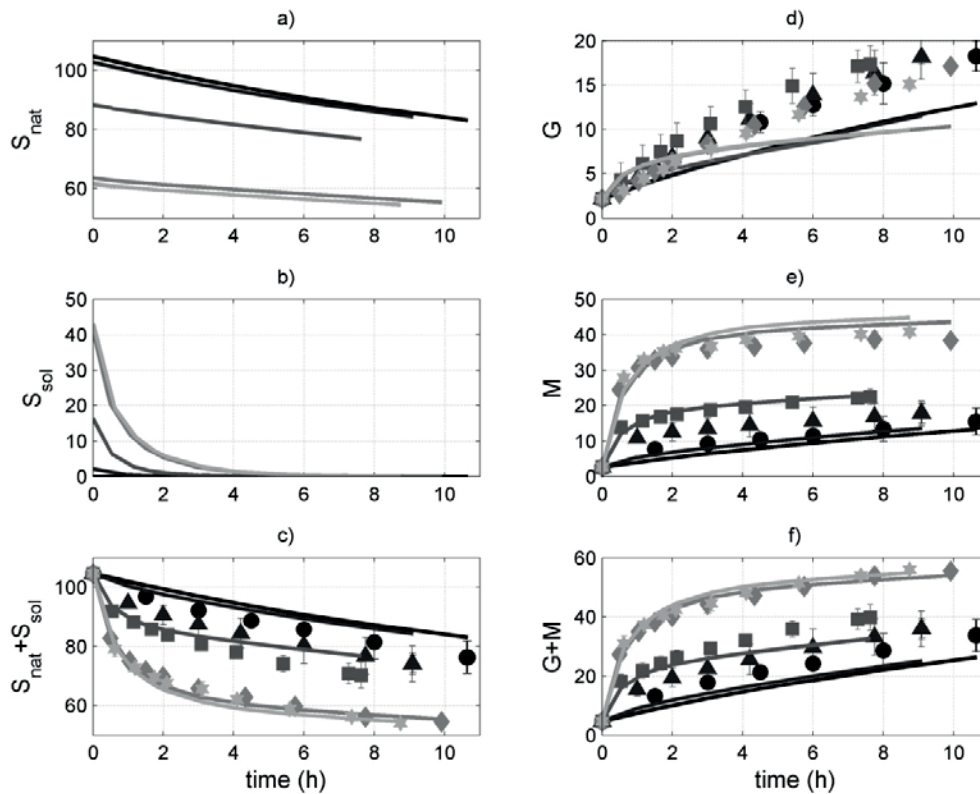


Fig. 3. Changes in concentrations of native (S_{nat}) and soluble gelatinized (S_{sol}) starch with different initial proportions 104/0(•, -), 101/3(▲, -), 78/26(■, -), 38/66(*, -), 35/69(*, -) $g.L^{-1}$ (a-c) and corresponding sugar release glucose (G) and maltose (M) (d-f) during hydrolysis at 37 °C. Experimental and modeled data are presented in symbols and solid line respectively

To model the degradation of both native (S_{nat}) and soluble gelatinized (S_{sol}) starch and to obtain unbiased estimators, native starch enzymatic parameters were set to the previous values obtained on native starch (Table 2) and V_{max}^{sol} , K_m^{sol} were adjusted according to the system of equations 6, 7 and 8. K_i was assumed to be the same as for native starch. Unlike for native starch, the Michaelis Menten reparametrized equation (eq. 12) could not be used in this case because of the non-negligible product inhibition. We found that the non-reparametrized equation gave estimators that were very dependent on the initialization values, leading to values of K_m and V_{max} that varied by a factor of up to 40. However they varied in the same way, and the $K_m: V_{max}$ and $K_m: K_i$ ratios gave robust, constant values. These ratios were used to calculate of the values of the parameters listed in Table 2. Predicted values were close to the experimental data (Figure 3, solid lines). The decrease in total starch was well represented (Figure 3c). We can therefore assume that the modeled concentrations of S_{nat} and S_{sol} are realistic (Figure 3a-b). The solubilized fraction of gelatinized starch *sol* (eq. 6 and 7) was found to be 0.6. It is noteworthy to mention that the inclusion of this parameter was important

to obtain a good fit with experimental data especially with high concentrations of gelatinized starch. Indeed, experimental data show a rapid total consumption of gelatinized starch but a slower hydrolysis rate after 5 hours revealing a residual non soluble gelatinized starch exhibiting the same consumption kinetic as native starch. Concerning sugar production, glucose is underestimated by the model whereas maltose is overestimated. One can assume maltose is converted into glucose due to glucosidase activity, as evidenced by Agu and Palmer (1997) in sorghum malt. This reaction should be taken into account in further studies. Comparison of the kinetic parameters between native and soluble starch showed that V_{\max} was multiplied 12-fold while K_m was reduced 5-fold when the starch was soluble. Even if the V_m ratio was high, the hydrolysis of native starch was not negligible and was clearly evidenced in the last part of the hydrolysis runs (after approximately 5 hours). Table 2 shows that for gelatinized starch, K_m^{sol} is in the same order of magnitude as K_i (22.0 and 14.1 g.L⁻¹, respectively). This result is in agreement with the work of Seigner *et al.* (1985) and Warren *et al.* (2012) on gelatinized starch hydrolysis by porcine pancreatic α -amylase with maltose inhibition.

3.5 Validation of the model

The previously developed lactic acid bacteria growth model (Munanga *et al.*, 2016) was used. Briefly, the growth of lactic acid bacteria was modeled using Rosso's primary model and the gamma concept as a secondary model; the optimum values of pH and temperature were 8.3 and 44.6°C, respectively, with μ_{opt} of 1.4 for *L. plantarum*. This bacterial growth model and the amylase and starch hydrolysis model developed in the present study were combined in a global model. The validity of the resulting global model was tested for the manufacture of gowé at laboratory scale under conditions close to those used in the traditional process, i.e. fermentation at 27.5 °C after inoculation with *L. plantarum* at 5 10⁵ CFU.g⁻¹ with no control of pH. The simulated responses obtained from the global model (bacterial growth, lactic acid production, pH, amylase activity, maltose and glucose content) were compared with the experimental values determined on samples collected during an experimental

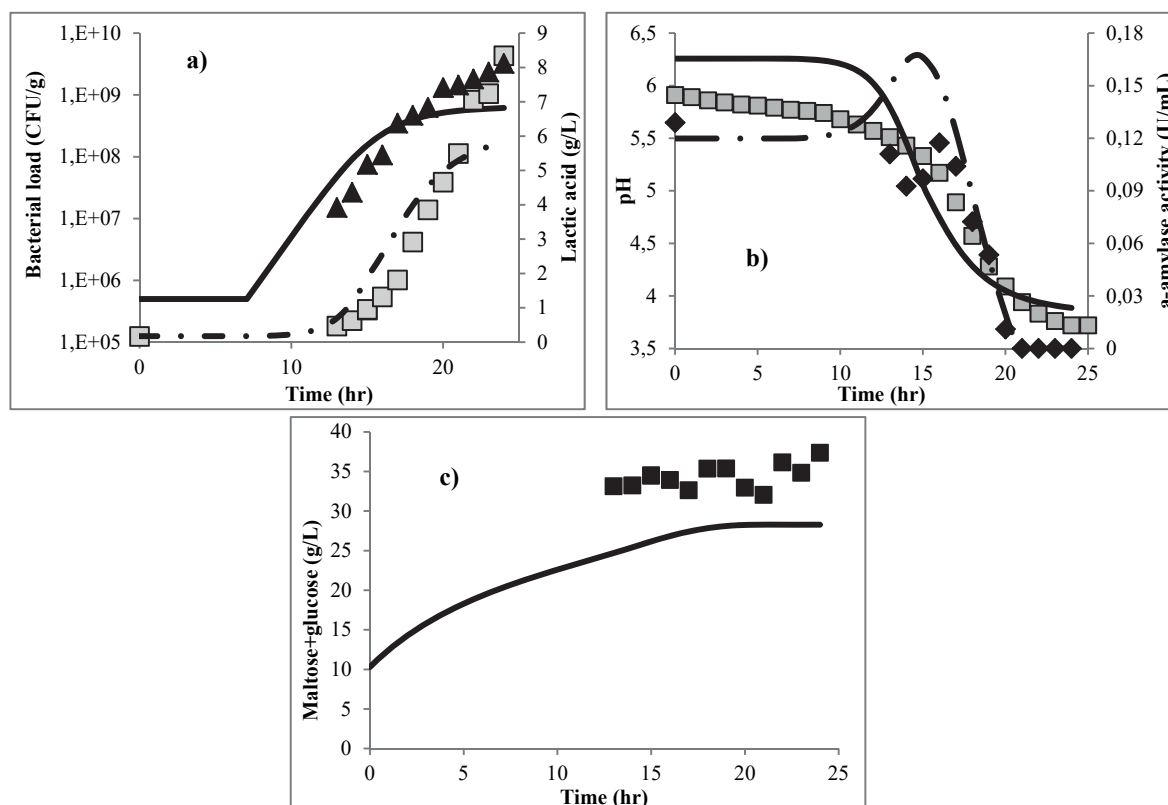


Fig. 4. Modeled curves (continuous lines) and experimental data (symbols) of gowé fermentation at 27.5 °C after pre-cooking at 72 °C and inoculation with *Lb. plantarum* at 5 10⁵ CFU/g. (a), Changes in the bacterial population (▲, —) and lactic acid production (■, - -), (b), pH (□, —) and α-amylase activity (◆, - -), (c) combined concentration of glucose and maltose (■, —).

fermentation. As already reported in a previous paper (Munanga *et al.*, 2016), the simulated growth of *L. plantarum* (Figure 4a) fitted the experimental data quite well, but with a difference of one log unit at the end of fermentation. Similarly, the production of lactic acid changes in pH during fermentation was satisfactory predicted by the model (Figure 4a-b).

The model predicted stabilization of α-amylase activity for 9 h followed by maximum activity after 15 h of fermentation, which coincided with the optimum pH (pH 5.2) of α-amylase. A sharp drop in activity was then predicted until its complete inhibition when the pH dropped to 4. The experimental values of α-amylase activity clearly fitted the predicted values with a total inhibition after 21 h for both experimental and predicted values. Figure 4c shows changes in the concentration of free sugars (glucose + maltose) during fermentation. The model predicted an increase in free sugars in the fermenting gowé during the first 20 h of fermentation, followed by a plateau at 28 g/L. The experimental data showed the same tendency, but with a slightly higher concentration of free sugar (5-9 g/L more). This may be linked to the action of other amylases (beta-amylase, alpha-amylase of the raw sorghum) that were neglected in the model. It should be noted that when gowé is fermented by inoculation

with *L. plantarum*, the release of free sugars due to the action of α -amylase stopped at the same time as bacterial growth; both were inhibited at pH 4, which corresponded to a concentration of undissociated lactic acid close to the MIC (minimum inhibitory concentration) of *L. plantarum* (Munanga *et al.*, 2016). In our fermentation conditions, no decrease in the concentration of free sugars was observed, as their release by α -amylase was higher than or equivalent to their consumption by the bacteria.

3.6 Use of the model

Despite some discrepancies with actual values, the model can already be used to test various scenarios of inoculation (choice of the inoculation strain, level of inoculation) pre-fermentation (pre-cooking) and fermentation (temperature and duration of fermentation) conditions that will directly affect the amount of lactic acid produced by the growth of lactic acid bacteria and therefore the decrease in pH, and hence the final quality of gowé (starch hydrolysis and concentration of free sugars). We compared three scenarios by changing only one parameter of the previous fermentation conditions while keeping the others constant: (i), pre-cooking of the flour at 80 °C (instead of 72 °C, giving a close to 100% gelatinization level in the precooked paste), (ii), inoculation level of $5 \cdot 10^6$ CFU/g (instead of $5 \cdot 10^5$ CFU/g), (iii), fermentation at 40 °C, close to the optimum temperature of growth of *L. plantarum* (instead of 27.5 °C).

The increase in the pre-cooking temperature did not affect bacterial growth, the lactic acid level and consequently amylase activity (Figure 5a-d). However it increased the final concentration of free sugars by 20 g/L due to the higher initial level of soluble starch which is rapidly hydrolyzed (Figure 5f). This produces gowé with better organoleptic properties: very sweet and less viscous due to increased starch hydrolysis (Adinsi *et al.*, 2014, 2015). The higher level of inoculation shortened the duration of fermentation by five hours; drop in pH, end of bacterial growth and of α -amylase activity appeared 5 hours before. However it did not really affect the final free sugar content. The increase in the fermentation temperature shortened fermentation by five hours, but also increased free sugar content as α -amylase activity was doubled at a temperature closer to its optimum temperature (Figure 5d).

On the whole, the fermentation of gowé took less than 24 h, and around 15 h in the case of a high level of inoculation and a high fermentation temperature. In all cases, the model showed -and the validation experiment confirmed- that bacterial growth and starch hydrolysis stopped at the same time. The resulting gowé had less sugar (75-135 g/kg, db) than the maximum level in traditional products (200-300 g/kg), i.e. after 24 h of fermentation (Dalodé-Vieira *et*

al., 2015; Michodjèhoun-Mestres *et al.*, 2005). The model showed that a lower level of inoculation or the use of a heterolactic strain, such as *L. brevis*, which produces less lactic acid, indeed increased the duration of fermentation but without significantly increasing the final concentration of free sugars (data not shown). The hydrolysis of soluble starch was completed within 15 hours and a longer fermentation only marginally increased the final concentration of free sugars due to the low hydrolysis kinetics of native starch (Figure 5e). The increase in the proportion of malt (up to 25%, like in the traditional product) was also unsuccessful, for the same reason. The pre-cooking step thus appears to be indispensable to increase the concentration of free sugars in the final gowé. Another option is increasing the fermentation temperature, which favored amylase action over bacterial growth, thus slightly increasing the final concentration of free sugars.

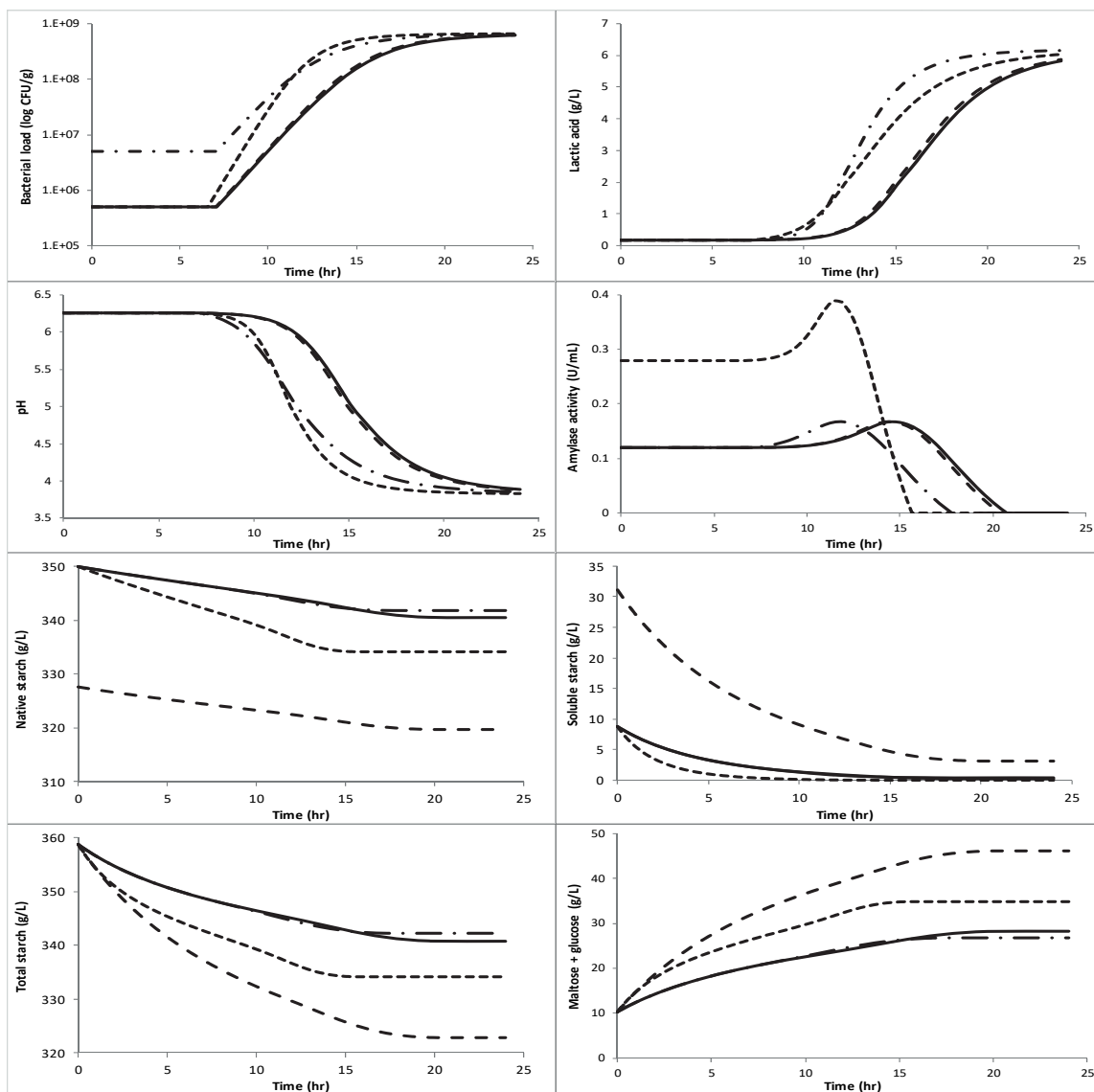


Fig. 5. Simulated values for gowé fermentation in the same conditions as in Figure 4 (—), but with pre-cooking at 80 °C (- -), or with inoculation at $5 \cdot 10^6$ CFU/g (-·-). Changes in the bacterial

population (a), lactic acid production (b), pH (c), α -amylase activity (d), native (e), soluble (f) and total starch (g) and combined concentration of glucose and maltose (h).

Conclusion

This paper described the modeling of a process of pre-cooking and fermentation of gowé coupling both microorganism and amylase activities as a function of temperature and pH and enabling control of both the microbiological and organoleptic properties of the final product, particularly sugar content. This was made possible by identifying the parameters of amylase kinetics, including the product inhibition constant, of both native and gelatinized starch hydrolysis. The robustness of the parameter estimators was ensured by a step by step identification on sets of experiments made with different proportions of native and gelatinized starch by adjusting the pre-cooking temperature. Finally, this complete model, which was validated on experimental data, shows that both pre-cooking and fermentation parameters, particularly temperature, are significant levers for controlling acid and sugar content but also the expected viscosity of the final product. This generic approach could be used as a tool for sanitary (rapid acidification) and sensory quality optimization in the fermentation of other starchy products.

References

- Adefila, O. A., Bakare, M. K., & Adewale, I. O. (2012). Characterization of an α -amylase from sorghum (*Sorghum bicolor*) obtained under optimized conditions: Characterization of an α -amylase from sorghum. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(1), 63–69. <https://doi.org/10.1002/jib.11>
- Adewale, I.O., Agumanu, E.N. & Oti-Okoronkwo, F.I.(2006). Comparative studies on alpha-amylases from malted maize (*Zea mays*), millet (*Eleusine coracana*) and Sorghum (*Sorghum bicolor*). *Carbohydrate polymers*, 66, 7174.
- Adinsi, L., Akissoé, N. H., Dalodé-Vieira, G., Anihouvi, V. B., Fliedel, G., Mestres, C., & Hounhouigan, J. D. (2015). Sensory evaluation and consumer acceptability of a beverage made from malted and fermented cereal: case of gowe from Benin. *Food Science & Nutrition*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/fsn3.166>
- Adinsi, L., Vieira-Dalode, G., Akissoe, N., Anihouvi, V., Mestres, C., Jacobs, A., Hounhouigan, D. J. (2014). Processing and quality attributes of gowe: a malted and fermented cereal-based beverage from Benin. *Food Chain*, 4(2), 171–183.
- Agu, R. C., & Palmer, G. H. (1997). Alpha-glucosidase activity of sorghum and barley malts. *Journal of the Institute of Brewing*, 103(1), 25–29.

- Akissoé, N. H., Sacca, C., Declémy, A.-L., Bechoff, A., Anihouvi, V. B., Dalodé, G., Tomlins, K. I. (2015). Cross-cultural acceptance of a traditional yoghurt-like product made from fermented cereal: Cross-cultural acceptance of cereal yoghurt. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(9), 1876–1884. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6892>
- Apar, D. K., & Özbek, B. (2007). Estimation of Kinetic Parameters for Rice Starch Hydrolysis Inhibited by Added Materials. *Chemical Engineering Communications*, 194(3), 334–344. <https://doi.org/10.1080/15397730600830039>
- Bertoft, E., & Henriksnas, H. (1982). Initial-stages in alpha-amylolysis of barley starch. *Journal of the Institute of Brewing*, 88(4), 261–265.
- Bialas, W., Czerniak, A., & Szymanowska-Powalowska, D. (2014). Kinetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation of corn starch for ethanol production. *Acta Biochim Pol*, 61(1), 153–162.
- Biazus, J. P. M., Souza, R. R. de, Márquez, J. E., Franco, T. T., Santana, J. C. C., & Tambourgi, E. B. (2009). Production and characterization of amylases from *Zea mays* malt. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(4), 991–1000. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000400024>
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36(6), 527–543. [https://doi.org/10.1016/s0963-9969\(03\)00009-7](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(03)00009-7)
- Brandam, C., Meyer, X. M., Proth, J., Strehaiano, P., & Pingaud, H. (2003). An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing. *Biochemical Engineering Journal*, 13(1), 43–52.
- Dalodé-Vieira, G., Akissoé, N. H., Hounhouigan, J. D., Jakobsen, M., & Mestres, C. (2015). Dextrin, sugar and organic acid profiles of spontaneous and modified gowe: A malted and fermented sorghum beverage from Benin. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(2), 549–557. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12708>
- Davis, R. A. (2007). Parameter Estimation for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Food Waste Into Ethanol Using Matlab Simulink. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 147(1–3), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8045-7>
- Davis, R. A. (2008). Parameter estimation for simultaneous saccharification and fermentation of food waste into ethanol using Matlab Simulink. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 147, 11–21.
- De Levie, R. (2001). *How to use Excel in analytical chemistry and in general scientific data analysis*. Cambridge; New York: Cambridge University Press.

- Egwim, E. C., & Oloyede, O. B. (2006). Comparison of □Comparison of Oloyede, O. B. (2006).17/CBO97805118082*Biokemistri*, 18(1), 15-20.
- Emenike, O. B., Chibuzo, C. F., & Sabinus, O. E. (2015). Characterization of Partially Purified-amylase from Germinating African Breadfruit (*Treculia africana*) Seeds. *International Journal of Pharmacy and Medical Sciences* 5 (1), 15-21.
- Gadaga, T. H., Mutukumira, A. N., Narvhus, J. A., & Feresu, S. B. (1999). A review of traditional fermented foods and beverages of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*, 53(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00154-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00154-3)
- Galanakis, C. M., Patsioura, A., & Gekas, V. (2015). Enzyme Kinetics Modeling as a Tool to Optimize Food Industry: A Pragmatic Approach Based on Amylolytic Enzymes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(12), 1758–1770. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.725112>
- Gonzalez, K., Tebbani, S., Lopes, F., Thorigné, A., Givry, S., Dumur, D., & Pareau, D. (2016). Modeling the continuous lactic acid production process from wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 147–159.
- Heitmann, T., Wenzig, E., & Mersmann, A. (1997). Characterization of three different potato starches and kinetics of their enzymatic hydrolysis by an alpha-amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 259–267.
- Hetenyi, K., Nemeth, A., & Sevelia, B. (2011). Investigation and modeling of lactic acid fermentation on wheat starch via SSF, CHF and SHF technology. *Periodica Polytechnica-Chemical Engineering*, 55(1), 11–16. <https://doi.org/10.3311/pp.ch.2011-1.02>
- Hill, G. A., Macdonald, D. G., & Lang, X. (1997). alpha-Amylase inhibition and inactivation in barley malt during cold starch hydrolysis. *Biotechnology Letters*, 19(11), 1139–1141.
- Ho, Y. K., Doshi, P., Yeoh, H. K., & Ngoh, G. C. (2015). Why are two enzymes better than one for the efficient simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of natural polymers? Hints from inside and outside a yeast. *Industrial and Engineering Chemistry*, 54, 10228–10244.
- Holm, J., Björck, I., Drews, A., & Asp, N. G. (1986). A rapid method for the analysis of starch. *Starch*, 38(7), 224–226.
- Huet, S., Jolivet, E., & Messéan, A. (1992). *La régression non-linéaire: méthodes et applications en biologie*. Paris.
- Ikram-Ul-Haq, Javed, M. M., & Hameed, U. (2010). Kinetics and thermodynamic studies of alpha amylase from *Bacillus licheniformis* mutant. *Pak. J. Bot*, 42(5), 3507–3516.

- Koljonen, T., Hämäläinen, J. J., Sjöholm, K., & Pietilä, K. (1995). A model for the prediction of fermentable sugar concentrations during mashing. *Journal of Food Engineering*, 26(3), 329–350. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(94\)00061-D](https://doi.org/10.1016/0260-8774(94)00061-D).
- Konsula, Z., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 39(11), 1745–1749. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.07.003>
- Kumar, R. S. S., Singh, S. A., & Rao, A. G. A. (2005). Thermal Stability of α -Amylase from Malted Jowar (*Sorghum bicolor*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6883–6888. <https://doi.org/10.1021/jf0501701>
- Kumar, R. S. S., Vishwanath, K. S., Singh, S. A., & Rao, A. G. A. (2006). Entrapment of α -amylase in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization. *Process Biochemistry*, 41(11), 2282–2288. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.028>
- Lauro, M., Suortti, T., Autio, K., Linko, P., & Poutanen, K. (1993). Accessibility of barley starch granules to alpha-amylase during different phases of gelatinization. *Journal of Cereal Science*, 17(2), 125–136. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1993.1013>
- Maktouf, S. (2013). A New Raw-Starch-Digesting α -Amylase: Production Under Solid-State Fermentation on Crude Millet and Biochemical Characterization. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(4), 489–498. <https://doi.org/10.4014/jmb.1211.11027>
- Marc, A., Engasser, J. M., Moll, M., & Flayeux, R. (1983). A kinetic model of starch hydrolysis by α - and β -amylase during mashing. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(2), 481–496.
- Mestres, C., Nguyen, T. C., Adinsi, L., Hounhouigan, J. D., Fliedel, G., & Loiseau, G. (2015). The interaction between starch hydrolysis and acidification kinetic determines the quality of a malted and fermented sorghum beverage. *Journal of Cereal Science*, 63, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.02.004>
- Michodjèhoun-Mestres, L., Hounhouigan, D.J., Dossou, J., & Mestres, C. (2005). Physical, chemical and microbiological changes during natural fermentation of “gowé”, a sprouted or non sprouted sorghum beverage from West-Africa. *African Journal of Biotechnology*, 4(6), 487–496.
- Muller, R. (2000). A mathematical model of the formation of fermentable sugars from starch hydrolysis during high-temperature mashing. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(3), 337–344.
- Munanga, B., Loiseau, G., Grabulos, J., & Mestres, C. (2016). Modeling Lactic Fermentation of Gowé Using *Lactobacillus* Starter Culture. *Microorganisms*, 4(4), 44.

- Nirmala, M., & Muralikrishna, G. (2003). Properties of three purified α -amylases from malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15). *Carbohydrate Polymers*, *54*(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00151-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00151-6)
- Olofsson, K., Bertilsson, M., & Liden, G. (2008). A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, *1*. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-7>
- Pasari, A. B., Korus, R. A., & Heimsch, R. C. (1988). Kinetics of the amylase system of *Schwanniomyces castellii*. *Enzyme and Microbial Technology*, *10*(3), 156–160.
- Presečki, A. V., Findrik, Z., & Vasic-Racki, D. (2013). Mathematical modeling of maize starch liquefaction catalyzed by α -amylases from *Bacillus licheniformis*: Effect of calcium, pH and temperature. *Bioprocess Biosyst Eng*, *36*, 117–126.
- Ratkowsky, D. A. (1986). A suitable parameterization of the Michaelis-Menten enzyme reaction. *Journal of Biochemistry*, *240*, 357–360.
- Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S., & Flandrois, J. P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of Temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(2), 610–616.
- Saito, N., Horiuchi, T., Yoshida, M., & Imai, T. (1979). Action of human pancreatic and salivary α -amylases on maltooligosaccharides: evaluation of kinetic parameters. *Clinica Chimica Acta*, *99*, 253–260.
- Satomura, S., Okajima, S., Hamanaka, T., Shintani, A., Miyashita, Y., & Sakata, Y. (1984). Kinetics of human pancreatic and salivary α -amylases with carboxymethylamyloses as substrates. *Clinica Chimica Acta*, *138*(1), 21–29.
- Seigner, C., Prodanov, E., & Marchis-Mouren, G. (1985). On porcine pancreatic α -amylase action: kinetic evidence for the binding of two maltooligosaccharide molecules (maltose, maltotriose and o-nitrophenylmaltoside) by inhibition studies. *European Journal of Biochemistry*, *148*(1), 161–168. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08820.x>
- Steinkraus, K. H. (1983). Indigeneous fermented foods involving an acid fermentation. In K. H. Steinkraus (Ed.), *Handbook of indigeneous fermented foods* (pp. 95–299). New-York: Microbiology series.
- Steverson, E. M., Korus, R. A., Admassu, W., & Heimsch, R. C. (1984). Kinetics of the amylase system of *Saccharomycopsis fibuliger*. *Enzyme and Microbial Technology*, *6*(12), 549–554.
- Tawil, G., Viksø-Nielsen, A., Rolland-Sabaté, A., Colonna, P., & Buléon, A. (2012). Hydrolysis of concentrated raw starch: A new very efficient α -amylase from *Anoxybacillus*

flavothermus. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 46–52.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.005>

Taylor, J. R.N. (1004). Role of alpha-glucosidase in the fermentable sugar composition of sorghum malt mash. *Journal of the Institute of Brewing*, 100, 417–419.

Vidal, V., Pons, B., Brunnschweiler, J., Handschin, S., Rouau, X., & Mestres, C. (2007). Cooking behavior of rice in relation to kernel physicochemical and structural properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 336–346.

Warren, F. J., Butterworth, P. J., & Ellis, P. R. (2012). Studies of the effect of maltose on the direct binding of porcine pancreatic α -amylase to maize starch. *Carbohydrate Research*, 358, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.004>

Wingren, A., Galbe, M., & Zacchi, G. (2003). Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*, 19(4), 1109–1117. <https://doi.org/10.1021/bp0340180>

Yankov, D., Dobрева, E., Beschkov, V., & Emanuilova, E. (1986). Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable α -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(11), 665–667.

Zwietering, M. H., Wiltjes, T., Rombouts, F. M., & van't Riet, K. (1993). A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods. *Journal of Industrial Microbiology*, 12(3–5), 324–329.

3.3 Troisième partie : Modeling mixed fermentation of the Gowé using selected *Lactobacillus plantarum* and *Pichia kluyveri* strains

3.3.1 Résumé introductif au chapitre

L'objectif est de finaliser le modèle global de la fermentation du gowé en agrégeant : le modèle de la fermentation lactique présenté dans la première partie des résultats, le modèle relatif de la saccharification présenté en seconde partie et un modèle de croissance d'une souche commerciale de *Pichia kluyveri*. La stratégie modélisation de la croissance de la souche de *P. kluyveri* est la même que celle utilisée pour *Lactobacillus plantarum* mais en bouillon Malt Extract. Les effets pris en compte sont : la température, le pH, la concentration totale en acide lactique et en éthanol. L'équation de Monod a été mobilisée pour modéliser l'effet des concentrations limitantes en glucose. Pour des concentrations en glucose plus élevées, l'équation utilisée prend en compte une constante d'inhibition. Le modèle de croissance de la souche de *L. plantarum* a été complété avec la détermination de sa CMI en éthanol et de la valeur sa constante d'affinité (K_s) et d'inhibition (K_i) pour le glucose. Le modèle de croissance de la souche *P. kluyveri* été validé dans du milieu Malt Extract et lors de fabrication de gowé à l'échelle du laboratoire Il prédit bien l'évolution de la population de *P. kluyveri* et celle du pH. Des fabrications de gowé à l'échelle du laboratoire mettant en jeu la souche de *L. plantarum* et celle de *P. kluyveri* ont été réalisées selon différentes conditions d'inoculation, de température de fermentation et de proportion de farine précuite dans le mélange initial. La confrontation des données expérimentales avec les données prédites par le modèle fait apparaître des écarts qui semblent dus à l'absence de prise ne compte d'une activité amylasique dans la farine responsable de l'augmentation de la teneur initiale en sucres et à l'éventuel développement de la microflore sauvage présente dans la farine et le malt malgré le traitement de décontamination par irradiation. La sous-estimation de la population lactique par le modèle pourrait être aussi due à une interaction positive de la levure sur la croissance de la souche lactique. Des validations réalisées avec un milieu de composition proche au mélange de farine et de malt de gowé avant fermentation permettraient de vérifier la fiabilité du modèle et de lever les interrogations précitées. Malgré cela, le modèle global apparaît comme un outil capable de prévoir la qualité finale du gowé en fonction de l'inoculum, des conditions de la fermentation, de la précuisson de la farine et de la composition du mélange initial. Ainsi, les résultats d'une simulation montrent qu'il est possible de produire en 15 heures un gowé suffisamment acide pour assurer sa qualité sanitaire et présentant une faible teneur en éthanol et une teneur en sucres suffisante.

Modeling mixed fermentation of the Gowé using selected *Lactobacillus plantarum* and *Pichia kluyveri* strains

Bettencourt de J. C. Munanga¹, Joël Grabulos³, Christian Mestres³, Gérard Loiseau².

1 Instituto Superior de Tecnologia Agro-Alimentar de Malanje – ISTAM, EN. 230, Cangambo, Malanje -Angola ; kudymwena@yahoo.com.br

2 Qualisud, Montpellier SupAgro, Montpellier SupAgro, INRA, CNRS, Univ. Montpellier, UMR 95 Qualisud, TA B-95/16, F-34398 Montpellier Cedex 5, France ; loiseau@cirad.fr

3 CIRAD, UMR Qualisud TA B-95/16, 73 rue Jean-François Breton, 34398 Montpellier Cedex 5, France ; joel.grabulos@cirad.fr ; christian.mestres@cirad.fr

* Correspondence: loiseau@cirad.fr; Tel.: +33-(0)467-615

Abstract

This article aim to develop a mixed fermentation model by assembling blocs hosting models for lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum*) and yeast strain (*Pichia kluyveri*) growth, metabolic production and physico-chemical changes during the fermentation of Gowé. Rosso's primary model and gamma model were used. The optimal values of pH and temperature for *P. kluyveri* were 4.3 ± 0.2 , $37.6 \pm 0.6^\circ\text{C}$ respectively with an optimal growth rate of $0.72 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$. MIC for total lactic acid and ethanol were of $398.7 \text{ mM} \pm 5.9$ and $5.03 (\pm 0.02) \%v/v$, respectively. K_s and K_i values for glucose of the strain *Pichia kluyveri* were $0.68 \pm 0.11 \text{ g.L}^{-1}$ and a K_i of $86.3 \pm 23.3 \text{ g.L}^{-1}$, respectively. For *L. plantarum* K_s value for glucose was 1.44 g.L^{-1} . Values of MIC for ethanol of *L. plantarum* strain was 6.29%. The comparison of the experimental data with those predicted by the model reveals differences which do not seem to be related to the quality of the model developed which it appears already as a tool for predicting the quality of the final product. By carrying out simulations it can be predict that with the two strains used, it would be possible to obtain after 13 hours of fermentation a sufficiently acidic and sweetened product having very low ethanol content. Incensement of the predictions implies taking into account the amylase activity of sorghum flour and interactions that may between lactic bacteria and yeasts. If the use of sterile sorghum flour is not possible, the overall model should be validated during fermentation using a semisynthetic sterile medium with a composition as close as possible to the malt flour and sorghum mixture.

Key words: Mixed fermentation, Starter, Modelling, *Lactobacillus plantarum*, *Pichia kluyveri*, Saccharification, Gowé.

Introduction

Like in gowé, mixed fermentation occurs in many fermented food which appear as a microbial ecosystems involving more than one microbial strain in interaction with others on the same environment, for this reason, the study of these systems are not easy. Many different types of interactions can exist between microbial populations due competition for nutrients or by metabolites accumulation of produced by each of the populations (Smid and Lacroix, 2013). In mixed fermentations involving yeasts and lactic bacteria, yeasts appear to be active microorganisms synthesizing substances such as vitamins, amino acids and purines, or breakdown complex carbohydrates, which are essential for the growth of *Lactobacillus* species that need a more complex medium for optimal growth (Arroyo-López *et al.*, 2008). Species such as *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* assimilate the lactic acid formed by lactic acid bacteria, raising the pH and stimulating bacterial growth. The vitamin B production by *Acetobacter* spp. is used to the growth of other microorganisms during kefir fermentation (Leite *et al.*, 2013). Moreover, LAB produce lactic acid which leads to a lowering of the pH, which either inhibits the growth on undesired pathogens or promotes yeast growth (Viljoen, 2006).

Different mathematical models are used to study the behavior of a mixed fermentation. These models seek to elucidate the different mechanisms of interaction such as pH decrease, consumption of limiting substrate or the production of an inhibitory metabolite during a mixed culture fermentation. Two approaches are commonly used to model different competitions that may exist during the development of various microbial floras in a given environment: the Jameson effect and Lotka-Volterra competition model. Jameson effect is based on the hypothesis of the simultaneous deceleration of both microbial population and results from the competition for a common limiting resource (Cornu *et al.*, 2011). Lotka-Volterra model is a classical, long-established as the model to study interactions between different species in a same habitat, this model has been successfully used in a many different contexts of population dynamics (Dobrinevski and Frey, 2012), and this concept is largely used in ecology to investigate multispecies ecosystems (Kedia *et al.*, 2007). Dens *et al.*, (1999) have proposed a two-species continuous-time interaction model that takes into account the interactions between two microbial populations. In this model, the level of interaction of one population over the other is proportional to its population density and the coefficients of interaction are independent of the physiological state of the bacterial strains. In previous articles we have proposed a model of the fermentation of the gowé using single starter culture

of lactic acid bacteria (Munanga et al., 2016) and a second model of cereal starch hydrolysis during simultaneous saccharification and lactic acid fermentation of the gowé (Mestres *et al.*, 2017). The objective of this work is to provide an overall model of the fermentation of the gowé by integrating the cited previous models and growth model of *Pichia kluyveri* strain.

2. Material and methods

2.1. Raw material

Grains of red sorghum [*Sorghum bicolor*, *L. Moench*], traditionally used for preparing gowé, were purchased on the local market in Cotonou (Benin). Raw sorghum flour was prepared by directly grinding the grains in a Laboratory Mill 3100 (Perten Instruments Hagersten, Sweden) equipped with a 0.5mm stainless steel sieve Mesh. Malting was performed at laboratory as detailed in (Mestres *et al.*, 2015) malted grains were ground as for raw grains. Malted and non-malted sorghum flours were treated by gamma irradiation with 2 kGy (Ionisos Company, Danieux, France). After this treatment, residual yeast population was less than 10^2 CFU.g⁻¹ and residual lactic acid bacteria population was below the threshold of detection.

2.2 Microbial strains

Yeast *Pichia kluyveri* strain (VINIFLORA[®] FROOTZEN[®]) provided by Chr. Hansen Company (Prades-le-Lez, France) provided at frozen form and stored at -80°C. *Lactobacillus plantarum* (CNCMI-3069) was provided by Lesaffre Company (Marcq-en-Baroeul, France) as dry active bacteria stored at 4°C. For all experiments, dry active bacteria were directly inoculated.

2.2 Microbiological methods

Pre-culture of yeast strain

Pichia kluyveri strain was pre-cultivated by inoculating 1mL of the frozen strain stored at -80°C in 50 mL of malt extract media (Biokar-diagnostics, Beauvais, France) and incubated at 30°C for 24 h to achieve an absorbance of 2.2 at 600 nm corresponding to a population of 10^7 CFU.mL⁻¹.

YEPG broth: yeast extract: 10g.L⁻¹; bactopectone 20 g.L⁻¹, glucose 5g.L⁻¹, buffered pH 6 with 1M phosphate buffer

Batch cultures

Microbial growth in fermenter.

Six hundred milliliters glass double wall fermenters with a useful volume of 300 ml without aeration were used. The temperature of the outer jacket was controlled with a thermostatic water bath. A mild and constant homogenization was achieved using magnetic stirrer. The pH of the media was monitored and automatically adjusted with sterile 1 M sodium hydroxide. Microbial growth was monitored by in line near Infrared turbidity sensor (Optek FC20-ASD19-N, Elscolab, Arcueil, France). Cell count was expressed as CFU.mL⁻¹ according to a pre-established calibration curve for each strain.

pH and Temperature effect on the *Pichia kluyveri* growth rate

The effects of pH and temperature on the growth rate of *Pichia kluyveri* was determined by cultures in six hundred milliliters glass double wall fermenters with a useful volume of 300 ml of malt extract medium without aeration were used. pH range was from 2.5 to 9 at 30 °C and temperature range was from 2 °C to 45°C at pH 6.5.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration of lactic acid and ethanol:

The cultures tests were carried out with a Bioscreen C Type FP-1100-C (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette 91-France), in microplate of 100 wells of a useful volume of 300µl each, with control of Stirring and temperature (30°C) for yeast strain and 37°C for LAB strain. Turbidity was measured at wavelength 600 nm.

For *Pichia Kluyveri*, determination of MIC ethanol, YEP broth buffered at pH 6 (1M phosphate buffer) was used. Ethanol concentrations were ranged from 0 to 8% (v/v). For MIC lactic acid, YEP broth pH was 5 (1M phosphate buffer) and total lactic acid ranging from 0 to 275 mM. In all tests initial yeast population was 10⁶ CFU mL⁻¹ and five replicates were performed for each condition.

For *lactobacillus plantarum*, determination of MIC ethanol, MRS broth was used with ethanol concentration was ranged from 0 to 8% (v/v).

Determination of the Ks value for glucose of *Lactobacillus plantarum*

Cultures were carried out in six hundred milliliters glass double wall fermenters. YEP broth buffered at pH 6 (1M phosphate buffer) was used. The temperature was 30°C. Glucose concentrations was ranged from 0 to 20g.L⁻¹ level of inoculation was 10⁶ CFU mL⁻¹ and five replicates were performed for each condition

Determination of the Ks and Ki values for glucose of *Pichia kluyveri*

Microplate cultures were carried out with a Bioscreen C Type FP-1100-C (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette 91-France). YEP broth buffered at pH 6 (1M phosphate buffer) was used. The temperature was 30°C. Glucose concentrations was ranged from 0 to 50g.L-1 level of inoculation was 10⁶ CFU mL-1 and five replicates were performed for each condition

Enumeration of microbial populations

For LAB population by plating on de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS-agar, Biokar-diagnostics, Beauvais, France). MRS plates were incubated at 37°C for 48h. For the yeasts population by plating on Sabouraud chloramphenicol agar medium (Biokar-diagnostics, Beauvais, France), Sabouraud plates were incubated at 30°C for 48h.

Laboratory scale production of gowé

To produce 300g of gowé, 15g of non-malted flour are dispersed in 75 mL in deionized water and pre-cooked at 65 °C for 10 min, after cooling to 30°C. The cooked flour is added to 60 g of non-malted, 25g of malted flour in dispersed in 25mL of demineralized water and 125 mL of demineralized water. The inoculation immediately follows the preparation of the final mixture. Temperature was controlled during fermentation. pH values were registered every hour. Sampling was performed to measuring substrate and products concentration and to enumerating microbial populations by plating on MRS agar (lactic bacteria) and Sabouraud agar (yeast).

2.3 Chemical Analysis

Lactic acid and glucose contents were measured by HPLC using Aminex HPX-87H column (Biorad, Hemel Hempstead, GB) at 30°C. Samples were centrifuged at 7200 rpm for 5 min and filtered with 0.45 µm pore size. Refractive-index and UV (210 nm) detectors were used. The elution flow rate was 0.6 mL.min⁻¹ with 5 mM sulfuric acid.

2.4 Mathematical modeling

2.4.1 Primary and secondary models

The logistic growth model with delay Rosso (1995) was chosen to describe microbial growth (equation1).

$$\begin{cases} \frac{dNt}{dt} = 0 & \text{if } t \leq \lambda \\ \frac{dNt}{dt} = \mu_{max} Nt \left(1 - \frac{Nt}{N_{max}}\right) & \text{if } t > \lambda \end{cases} \quad (1)$$

Where N_t and N_{max} (CFU.L⁻¹), are the values of microbial population at time t and at the end of the growth curve, respectively, μ_{max} the maximal growth rate (h⁻¹) and λ the lag time (h).

The gamma concept model (Zwietering *et al.*, 1993) was used as secondary model to describe the impact of temperature, pH and undissociated lactic acid concentration ([AH]) on maximal growth rate (μ_{max}) (equation 2).

$$\mu_{max} = \mu_{opt} * \gamma(T) * \gamma(pH) * \gamma([AH]) * \gamma(EtOH) * \gamma(glucose) \quad (2)$$

With γ values between 0 and 1

The effect of the temperature and pH on μ_{max} was expressed using the Cardinal pH Model (CTPM) proposed by (Rosso *et al.*, 1995) according equation (3).

$$CMn(X) = \begin{cases} 0, & X \leq X_{min} \\ \frac{(X-X_{min})^n(X-X_{max})}{(X_{opt}-X_{min})^{n-1}\{(X_{opt}-X_{min})(X-X_{opt})-(X-X_{max})[(n-1)X_{opt}+X_{min}-nX]\}}, & X_{min} < X < X_{max} \\ 0, & X \geq X_{max} \end{cases} \quad (3)$$

Where X corresponds to environment factors such pH, temperature and ‘ n ’ values are 2 for temperature, respectively. For pH, we adjusted the value of the parameter ‘ n ’ to avoid a good sharp of the model.

Temperature and pH minimal cardinal values were determined by surface inoculation of MRS agar medium with drops of pre-cultivated strains on MRS broth at 37°C during 8h (achieving an absorbance of 1.4 at 600 nm). For the pH minimum value determination, MRS agar broth was buffered with phosphate buffer at ranging pH from 2.8 to 4, and incubated at 37°C for 48 h in anaerobic conditions using an anaerobic jar and a CO₂ generating packet anaerocult (MERCK, F-67120 Molsheim-France). For the minimum temperature, unbuffered MRS agar medium were inoculated with drops of pre-cultivated strains at 37°C during 8h and incubated at 10 or 15 °C for two weeks. Temperature and pH maximal values were determined experimentally on batch cultures.

Cardinal optimal values for pH, temperature and μ_{opt} of MRS broth were adjusted from a set of experiments: with pH ranging from 4.0 to 9.5 at 37°C and with temperature ranging from 20 to 55°C at pH 6.5.

Modeling the product formation and metabolite interaction

Equation (4) was used to model the ethanol formation by *Pichia kluyveri*, with $Y_{P/X}$ as the yield for ethanol over *Pichia kluyveri* growth (Van Impe *et al.*, 2005):

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \times \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

The effect of ethanol concentration on *Pichia kluyveri* and LAB strain growth was determined using equation (5) proposed by Coroller *et al.*, (2005).

$$\gamma([EtOH]) = 1 - \left(\frac{[EtOH]}{MIC}\right)^\alpha \quad (5)$$

Where [EtOH] represent the ethanol concentration in % v/v, MIC is the minimal inhibitory concentration of ethanol and α reflects a shape factor of the curve.

The MIC of lactic acid was calculated with the equation (6) as for ethanol.

Modeling the effect of the substrate

The Monod model (equation 6) was used to represent LAB growth under substrate-limited conditions as proposed by Sharma and Mishra (2014).

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_s + [S]} \quad (6)$$

Where [S] were the substrate (glucose) concentration in g.L⁻¹. K_s (g.L⁻¹) were the substrate concentration such that the rate of growth is half-maximal.

For taking into a consideration the inhibition on the growth of *Pichia kluyveri* by excess of substrate, the model was modified according to Song *et al.*, (2008) (equation 7).

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{\left\{ [S] + K_s + \left(\frac{[S]^2}{K_i} \right) \right\}} \quad (7)$$

Where K_i (g.L⁻¹) the inhibition constant.

Implementation of the mixed fermentation

To model the mixed fermentation we applied the global model of fermentation of lactic acid bacteria and of starch hydrolysis presented earlier by (Munanga *et al.*, 2016; Mestres *et al.*, 2017), added the models about the glucose and ethanol effects on LAB growth and the developed model for the growth of *Pichia kluyveri*. The models were implemented in Simulink (The Mathworks Inc., Natick, Mass, USA).

Statistical methods

The confidence intervals of means (at 95% probability) for non-linear and linear regressions were calculated using XLstat (Addinsoft, Paris). The cardinal values of Eq. 3 were fitted by the Levenberg–Marquardt method using the Macro Bundle such proposed by (De Levie, 2001).

Results and discussion

Pichia kluyveri growth model

The primary equation (1) logistics model fits the experimental data obtained in malt extract broth, at 30°C and pH 6.5, for the strain of *Pichia kluyveri* (figure 1). Under these conditions, the growth rate and t_{lag} values determined by the model were respectively $0.57h^{-1}$ and 2 h.

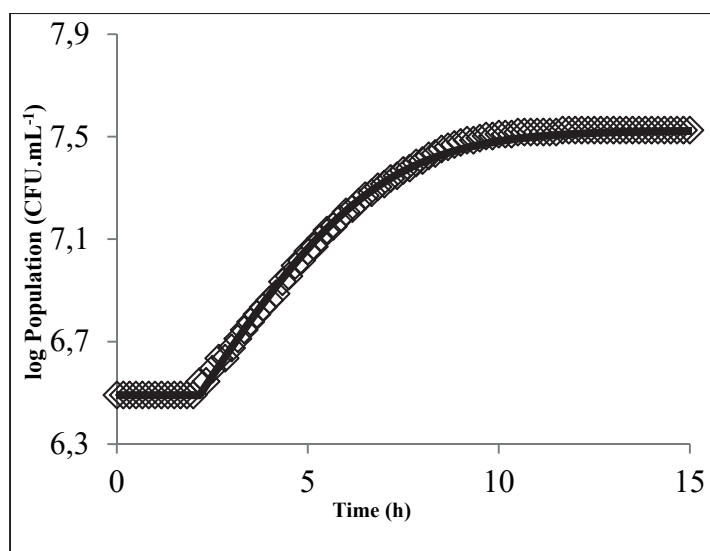


Figure 1: Growth of *Pichia kluyveri* (◊) in Malt Extract broth at 30 °C, pH 6.5. Experimental data (symbol) and predicted data (continuous line)

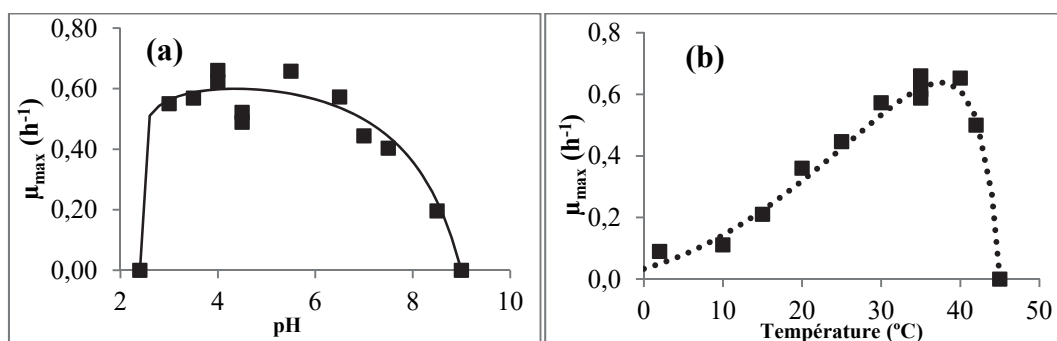
Kinetics parameters of *Pichia kluyveri* strain are shown in table1. The effects of temperature and pH on the growth rate of *Pichia kluyveri* strain were showed in figures 2a and 2b respectively. The value of the coefficient n which allows the best adjustment of the CTPM model for pH, to the experimental data is 0.1. The values μ_{opt} , pH_{opt} and $Temp_{opt}$ were adjusted using the minimum and maximum cardinal values determined experimentally.

The μ_{opt} (Malt Extract broth medium) of *Pichia Kluyveri* is $0.73h^{-1} \pm 0.03$ (Table1) is between the μ_{max} values, from 0.63 to $1.2h^{-1}$ cited by Hoppe, (1981) for *Saccharomyces cerevisiae* strain with glucose as energetic substrate and carbon source. Lower μ_{max} values were reported by Laplace *et al.*, (1991), 0.13 to $0.17h^{-1}$ for *Candida shihatae*, 0.11 to $0.20h^{-1}$ for *Pichia stipitis* and 0.30 to $0.34h^{-1}$ for *Saccharomyces cerevisiae*.

Studying the effect of temperature on the growth rate of *Kluyveromyces marxianus* strain, Rouwenhorst *et al.*, (1988) report a μ_{opt} value of $0.91 h^{-1}$, this value is slightly higher than the value found in this work.

Table 1: Parameters for the growth model of *Pichia kluyveri*

Modeled variable	Equation	Parameter	Value \pm CI (<i>Pichia kluyveri</i>)
μ_{\max}	(3)	pHmin	2.4
		pHmax	9.0
		pHopt	4.3 (± 0.2)
		n (pH)	0.1
		μ_{opt} (h^{-1})	0.72 (± 0.03)
		Tmin ($^{\circ}\text{C}$)	-9.2
		Tmax ($^{\circ}\text{C}$)	45
		Topt ($^{\circ}\text{C}$)	37.6 (± 0.6)
MIC	(5)	[LA] mM	398.7 (± 5.9)
MIC	(5)	[EtOH] % v/v	5.03 (± 0.02)
Ethanol production rate	(4)	$Y_{\text{Ethanol/N}}$ (mg.CFU $^{-1}$)	$2.13 \cdot 10^{-8}$ (± 0.025)
Glucose consumption rate		$Y_{\text{glucose/N}}$ (mg.CFU $^{-1}$)	$1.4 \cdot 10^{-7}$ (± 0.022)
Ratio ethanol/glucose		$Y_{\text{Ethanol/glucose}}$	$0.15 \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
[glucose]	(7)	K_s ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.68 (± 0.11)
		K_i ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	86.3 (± 23.3)


 Figure 2: Effect of environment factors on growth rate of *Pichia kluyveri*. pH effect (a) and temperature effect (b). Experimental data (symbol) and predicted data (dotted line).

A low impact of pH on the growth rate for values roughly between 2.5 and 6.2 was observed. The behavior of the *Pichia kluyveri* strain is similar to that reported for other yeast strains in identical pH ranges (Betts *et al.*, 1999), (Praphailong and Fleet, 1997) (Rouwenhorst *et al.*, 1988)

Cardinal temperature values are close to those cited in the literature. Salvadó *et al.*, (2011) for a *Saccharomyces cerevisiae* strain reported maximum temperatures between 24.5°C and 38.7°C, minimum temperatures between 1.25 °C and 4.71°C with a maximum temperature between 36.9C and 46°C. Using the experimental data from Rouwenhorst *et al.*, (1988) for a *Kluyveromyces marxianus* strain, we have determined minimum, maximum and optimum temperature values of 2°C, 50°C and 37.3°C, respectively.

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of lactic acid was determined as 398.7±5.9 mM (Table 1), close to the value of MIC (548 mM of lactic acid) for a strain of *Saccharomyces cerevisiae* presented by Thomas *et al.*, (2002). A higher MIC, 610 mM, was reported by Bayrock and Ingledew, (2004) for other yeast strains like as *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri*.

Pichia kluyveri produce ethanol and their growth are inhibited by ethanol content. The MIC value of ethanol for *Pichia kluyveri* was 5.03±0.02% (table 1). This value is close of these cited by Helle *et al.*, (2003) which report a MIC values between 5.4 and 6% for various strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Du Preez *et al.*, (1987) reported a MIC of 4.6 and 4.8% for *Pichia stipitis* and *Candida shihatae* strains respectively. Liu and Qureshi, (2009) determine MIC of 7 and 6% for *Zimomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* strains respectively. A slightly lower MIC was observed by (Delgenes *et al.*, 1988) while studying the growth of *Pichia stipitis*. Antoce *et al.*, (1996, 1997) reported an ethanol MIC of 6.23% for a *Candida utilis* strain and 8.98% for *Kluyveromyces marxianus* strain.

Very few data about glucose Ks value for *Pichia kluyveri* strains and still less concerning the inhibition of their growth by glucose have been published. A sharp increase of μ_{\max} was observed (figure 3) up to a glucose concentration of 6.7 g.L⁻¹ followed by a slight decrease. Constant value was determinate by the Monod equation with inhibition (eq. 7, table 1); The Ks value (0.68 g.L⁻¹) is very small while that of the Ki (86.3g.L⁻¹) is more than 100 times higher. This means that the maximum growth rate is reached for very low levels of glucose concentration and which remains relatively constant below 50 g per liter of glucose, lower than the glucose concentration during the fermentation of the glucose.

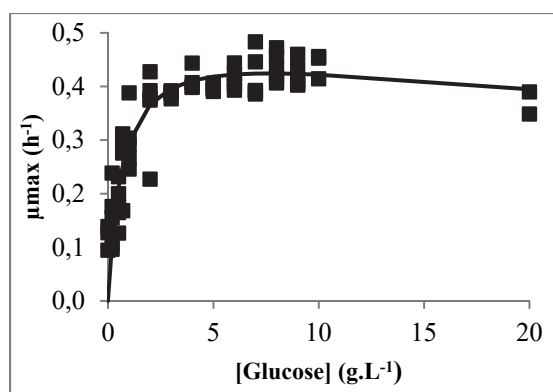


Figure 3: Effect of glucose concentration on *Pichia kluyveri* growth rate

Figure 4a shows relation between glucose concentration and the microbial load measured for various conditions of fermentation (pH, temperature). The rate of glucose to microbial load was $1.4 \cdot 10^{-7}$ mg.CFU⁻¹ in all growth conditions. Figure 4b Shows relation between ethanol production and the microbial load measured for various conditions of fermentation (pH, temperature). A constant rate of $2.13 \cdot 10^{-8}$ (± 0.025) mg.CFU⁻¹ was determined. The yield of glucose conversion to ethanol was 0.15g.g^{-1} . Data for *Pichia kluyveri* strains are not published, but we can mention those reported by Mussatto et al., (2012), such as 0.26g.g^{-1} for *Pichia stipitis*, 0.26g.g^{-1} for *Saccharomyces cerevisiae* and 0.13g.g^{-1} for *Kluyveromyces fragilis*. Lonvaud et al, (2010) reported a value close to 0.48g.g^{-1} for a *Saccharomyces cerevisiae* oenological strain

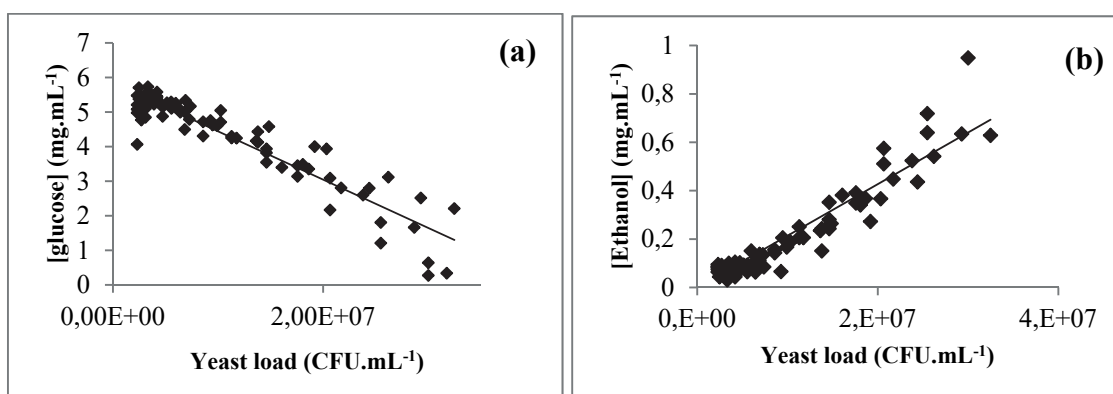


Figure 4: Regression between glucose concentration (a), ethanol concentration (b) and microbial load for *Pichia kluyveri* at different growth conditions of temperature and pH

Complementary model for LAB

A model has been already designed for LAB growth (Munanga *et al.*, 2016). In the case of a mixed culture with two strains, such as *Pichia Kluyveri* and *Lactobacillus plantarum*; the global model must take into account the impact of the glucose concentration, consumed competitively by the yeast, and the impact of the ethanol concentration produced by the yeast on the growth of the lactic strain. Table 2 presents the Ks values of glucose and MIC of the ethanol of the *Lactobacillus plantarum* strain.

Table 2: Effect of ethanol and glucose concentrations on *Lactobacillus plantarum* growth rate.

Modeled variable	Equation	Parameter	Value ± CI
			<i>L. plantarum</i>
MIC	6	[EtOH] (% v/v)	6.29 (±0.033)
		α	2.82 (±0.098)
[Glucose]	7	Ks (g.L ⁻¹)	1.44 (±0.029)

Ks value of 1.44 g.L⁻¹ was determined, which is it close to the values cited by (Charalampopoulos *et al.*, 2009) and (Sharma and Mishra, 2014) for *Lactobacillus plantarum*, at 1.48 and 1.32 g.L⁻¹, respectively.

MIC ethanol value shows a higher tolerance to ethanol by *Lactobacillus plantarum* strain with respect to *Pichia kluyveri*. (G-Alegría *et al.*, 2004) have reported MIC value up to 13% for *Lactobacillus plantarum* and (Liu and Qureshi, 2009) a MIC values of 14% for *Lactobacillus buchneri* and 18% for the species *Lactobacillus heterohiochii* and *Lactobacillus homorohiochii*, respectively.

Validation of the growth model of *Pichia kluyveri* strain

The global model of *Pichia kluyveri* has been tested in pure culture in YPG broth (figure 5) and in gowé manufacturing at lab scale (figure 6). For fermentation in YPG broth without pH control, model fit very well with the experimental data for yeast population, pH (Figure 5a), glucose consumption and ethanol production (Figure 5b). End of fermentation is clearly linked to the exhausting of glucose in accordance with Monod model used able to predict the

decrease then stop of growth in relation with glucose concentration. pH slightly decreased from 4.7 to 4.1 during the fermentation. The low drop of pH, could be linked to acetic acid production by *Pichia kluyveri*. The production of acetic acid was not taken into account in the global model because the production level is too low to influence the final pH of the gowé when it is produced by mixed (LAB and yeast) microbial population. Ethanol concentration was 2.38 g L^{-1} after 9 hours of fermentation.

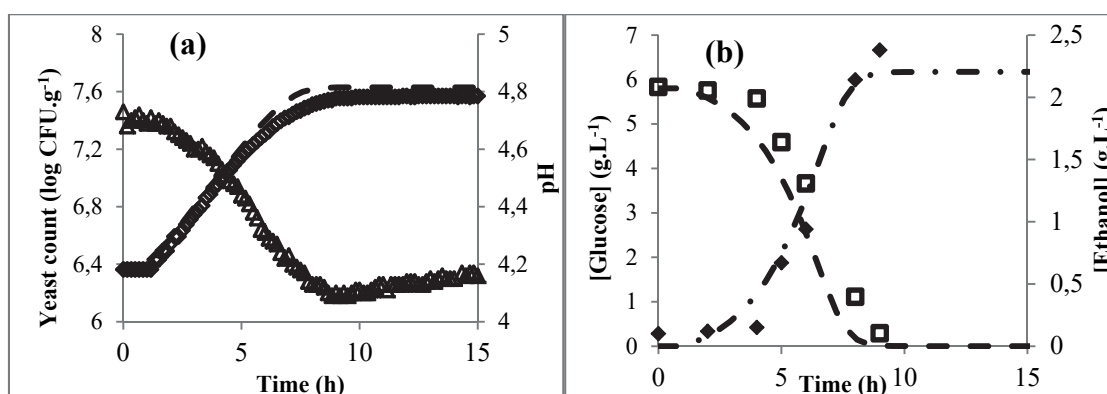


Figure 5: Changes in the log population (\diamond ,--) and pH (\triangle) (a), glucose (\square ,--) and ethanol (\blacklozenge ,--) concentrations (b) for the validation test performed at 30°C in YPG broth inoculated with *Pichia kluyveri*. Experimental data (symbol) and predicted data (dashed lines)

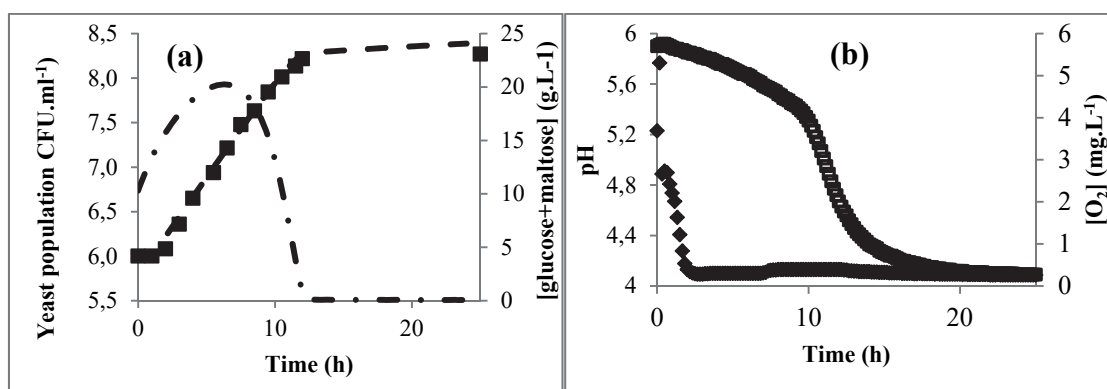


Figure 6: Changes in yeast population (\blacksquare , - -), glucose and maltose concentration (--) (a), in pH (\square) and soluble oxygen (\blacklozenge) (b) for the validation test for the fermentation of gowé at 30°C inoculated with *Pichia kluyveri*. Experimental data (symbol) and predicted data (dashed line)

For the fermentation of mix sorghum flour and malt (Fig. 6a), evolution of the population was correctly predicted by the model. Stopping of population growth occurs when glucose and maltose are depleted. The final yeast population was 10 times higher than that observed during the validation with YEP Broth due to the amylasique activity of malt Evolution of the

pH is carried out in two phases (FIG. 6b), the first from 5.9 to 5.4 in the first 10 hours can be linked to a low acetic acid production by the yeasts in aerobic condition and the second to pH 4.1 probably linked to wild lactic bacteria growth present in the raw material used.

Validation of the Global Model on mixed fermentation

Different conditions of gowé manufacture involving *Lactobacillus plantarum* and *Pichia kluyveri* were carried out to validate the global model of gowé fermentation (Table 3).

Table 3: Conditions for the validation tests (V0-3) and simulated fermentation (S1-2) of gowé

Experiments	Inoculation rate (CFU.g ⁻¹)		Fermentation temperature (°C)	Pre-cooked flour (g)	uncooked flour (g)	Pre-cooking temperature (°C)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pichia kluyveri</i>				
V1	7.3.10 ⁵	7.0.10 ⁵	25	15	60	80
V2	5.4.10 ⁶	1.8.10 ⁴	35	15	60	80
V3	5.8.10 ⁵	6.3.10 ³	40	20	55	80
S1	5.0.10 ⁵	5.0.10 ⁵	40	30	45	85
S2	1.0.10 ⁶	1.0.10 ⁵	40	30	45	85

Figure 7 shows the results of validation test V1 (25°C, Lb 10⁵/Pk 10⁵, M_{alt}15g, F_{flour} 60g, Pre_{cook} 80°C). The conditions for carrying out this test were close to those of the traditional method except for the inoculation by the two strains at a sufficiently high level. The model fit well the experimental data of the microbial population (figure 7a), with a slight underestimation of lactic population was observed. The stationary growth phase began after about 22 hours of fermentation. The model predicted quite well the values of the pH, the lactic acid concentration (figure 7b) and the ethanol (figure 7c) before 22 hours of fermentation. The concentration of sugars is underestimated by the model and final sugars concentration measured was between 5 and 10 g.L⁻¹ while the model predicted their total consumption. A low amylase activity naturally present in sorghum grain is not eliminated by grinding. Its expression in the flour not taken into account by the model would explain the high levels of glucose and maltose in the cooked flour. At pH 4, the model predicted stopping the growth of *Lactobacillus plantarum* strain (Munanga et al., 2016) and that of amylase activity (Mestres et al., 2017). This pH value was reached after about 22 hours of fermentation without any slowing of the production of lactic acid, whereas the concentration of lactic acid continued to increase, correlated with a small overestimation of the pH and a slight overestimation of the concentration of ethanol. Despite the irradiation treatment of flour

and malt, these two products are not sterile; part of the wild microflora of the sorghum persists at a low level of population. In the natural process of making gowé, this wild population adapted to its ecosystem that makes the fermentation. The observed deviations could be due to the growth of wild bacteria which would be more acidotolerant than the starter used. This hypothesis could explain the underestimation of the lactic population enumerated on MRS agar medium, a non-selective growth medium. Finally, it appears that the fermentation of the gowé according to the conditions of the V1 test would lead in 24 hours to a sufficiently acidic, slightly sweetened and low alcoholised product.

Figure 8 shows results of the validation test V2 (35°C, Lb 10⁶/ Pk 10⁴, P_{recook flour} 15g, F_{lour} 60g, P_{recook} 80°C). Conditions for carrying out this test include *Lactobacillus plantarum* population one hundred times greater than that of *Pichia kluyveri* and the fermentation temperature close to the optimum growth temperature of the two strains used (Munanga *et al.*, 2016). It was observed (figure 8a) that the model predicts poorly the level of yeast population and underestimates the lactic acid population. Maximal level of population was reached after 10 hours for lactic acid population when the pH value reached 4 (figure 8b). For yeast population the stationary phase was reached after 15 hours. For this population, was observed a biphasic evolution of growth, i.e. a break in slope was observed between 15 hours and 17 hours of fermentation, indicating a very marked slowdown in growth. The experimental data and the model data follow the same trend with respect to the evolution of the pH and that of the lactic acid concentration (figure 8b) but the model slightly underestimates the drop in pH. The model predicts that the pH 4 value is reached after 14 hours of fermentation, whereas this value was reached after 10 hours. Differences were observed between the experimental measurements of lactic acid concentration and those predicted by the model. The model predicts the end of the increase in lactic acid concentration after 14h of fermentation (pH 4) to a maximum final value of 6 g.L⁻¹ of lactic acid. The curve plotted with the experimental data was biphasic. A relatively fast first acid lactic production phase was observed before 17 hours of fermentation followed by a second phase of slower continuous acidification which reaches after 24 h of fermentation a value greater than 16g.L⁻¹. The sugar consumption curve and the ethanol production curve plotted with the experimental data are biphasic (figure 8c). Before 17 hours of fermentation, glucose / maltose concentration is well described by the model but that of the ethanol is underestimated. The value of the initial concentration of sugars is close to that measured during the V1 test. The explanation of this difference is the same as for the test V1. A slower decrease in sugar concentration and a slower production of ethanol after 17

hours of fermentation were observed. These observations must be related to the slowing growth of yeast population to the slowing of lactic acid production after 17 hours of fermentation. The hypothesis about the development of the microflora for test 1 may also explain the observed differences between the model predictions and the experimental data. In the validation test 2, it can be envisaged that after 17 hours of fermentation *Lactobacillus plantarum* and *Pichia kluyveri* strains were not predominant. In this hypothesis, the experimental data collected concern the growth of the wild microflora which cannot be correctly modeled. Finally, it appears that the fermentation of the gowé according to the conditions of the V2 test would lead after 14 hours to a sufficiently acidic, middle sweetened and low alcoholised product.

The conditions for carrying out the V3 (40°C, Lb 10⁵/ Pk 10⁴, P_{recook flour} 20g, F_{lour} 55g, P_{recook} 80°C) test differ from these of the V1 and V2 tests. Fermentation temperature is higher than the optimum growth temperature of the two strains used, Inoculation level was low with a ratio between the *Lactobacillus plantarum* and the *Pichia kluyveri* population equal to 10 and the quantity of pre-cooked flour increased by 25%. Figure 9a shows, that the lag phase of the lactic flora determined with the experimental data is about 4 hours almost half of what the model predicts. The model predicts a rapid onset of growth of the lactic acid flora but less than what has been observed. This difference is accentuated and the gap between the predictions of the model and those predicted increases to reach a log. The growth curve plotted with the experimental data was showed that the stationary phase was observed after about 12 hours of fermentation when the model predicts it at about 14 hours. The model predicts well the lag phase of the yeast population that is less than two hours. After 7 hours of fermentation, the model underestimates the yeast population. According to the experimental data, the stationary phase would take place after 12 hours of fermentation, in contrast to the model which predicts a continuous growth up to 24 hours of fermentation. Figure 9b, shows that the acidification kinetic predicted by the model is different from that observed. The initial value of the pH is overestimated and this difference was observed up to 15 hours of fermentation, which corresponds to the beginning of the stationary phase of the two enumerated microbial populations. The model well predicts the increase of the lactic acid concentration until 7 hours of fermentation. Model predicts a lactic acid concentration equal to 3g.L⁻¹ at the end of the exponential growth phase which is half of what was measured. The kinetics of consumption of sugars (glucose / maltose) and that of production of ethanol (figure 9c) predicted by the model do not agree with the experimental data. The value of the initial

concentration of sugars is higher than those measured in the tests V1 and V2, this being related to the increase in the quantity of precooked flour used in this test. This value increases slightly at the end of the fermentation, contrary to the prediction of the model. While model predicts a continuous increase in ethanol concentration, a very slight increase was observed. The high sugars concentration, not predicted could explain the production kinetics of lactic acid which seems be at the expense of ethanol which would mean predominant lactic acid fermentation. This may be related to the low level of inoculation of the *Pichia kluyveri* strain.

Finally, it appears that the fermentation of the gowé according to the conditions of the V3 test would lead after 12 hours to a sufficiently acidic, high sweetened and very low alcoholised product.

In all validation tests, the final pH value is well below 4.5, which is an effective barrier to contamination by pathogenic bacteria, according to Viljoen (2006), lactic acid produced at high level lead to drop of the pH inhibiting the growth of negative microflora and favoring the growth of yeasts.

The hypothesis that the under estimation of the lactic population is due to the development of a wild lactic flora has already been discussed, another hypothesis would be the existence of positive interactions between yeasts and lactic acid bacteria that should be taken into account in the global model. Such interactions have been reported by many authors. Segovia Bravo *et al.*, (2007) have observed this during green table olive fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus pentosus* strains. Yeast synthesizes vitamins, amino acids and purines, or carbohydrates essential for the growth of *Lactobacillus* species. Vitamin and co-factors accumulated and / or synthesized by yeast which activate the growth of lactobacilli include thiamine (vitamin B1), nicotinic acid, pyridoxine (vitamin B6) and pantothenic acid (Arroyo -López *et al.*, 2008). Gobbetti *et al.* (1994) showed a commensalistic relationship between yeasts and lactobacilli of leaven bread microbiota for the benefit of lactic bacteria, whose growth was more rapid in coculture with yeasts not affected by the presence of lactobacilli. De Vuyst and Neysens, (2005) reported the importance of antagonistic and synergistic interactions between *Lactobacillus* species and yeasts in sourdough microbiota.

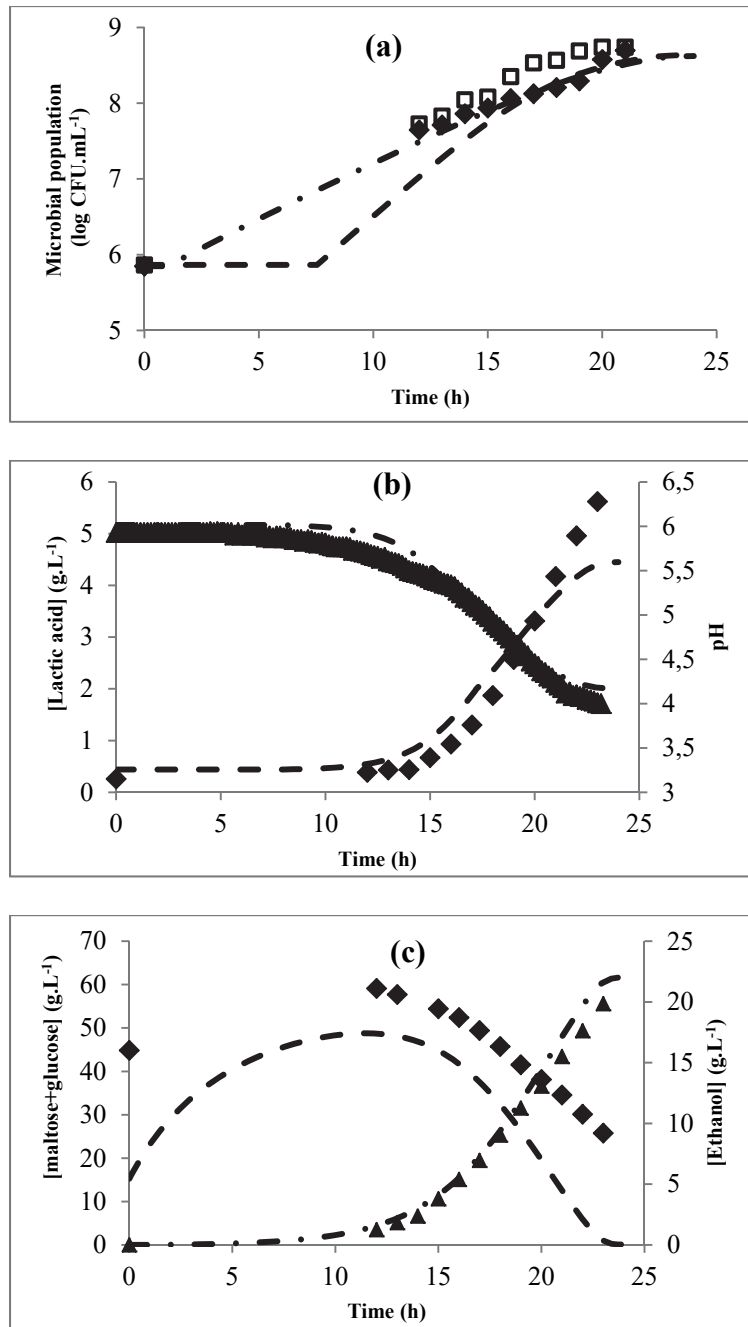


Figure 7: **(a)** Changes microbial population of *Lactobacillus plantarum* (□,- -) and *Pichia kluyveri* (◆, -.-); **(b)** in pH (▲,-.-) and lactic acid concentration (◆, -.-); **(c)** maltose + glucose concentration (◆, -.-) and ethanol (▲,-.-) for validation test V1 (25°C, Lb 10⁵/ Pk 10⁵, P_{recook flour} 15g, F_{lour} 60g, P_{recook} 80°C). Experimental data (symbol), predicted values (dashed lines)

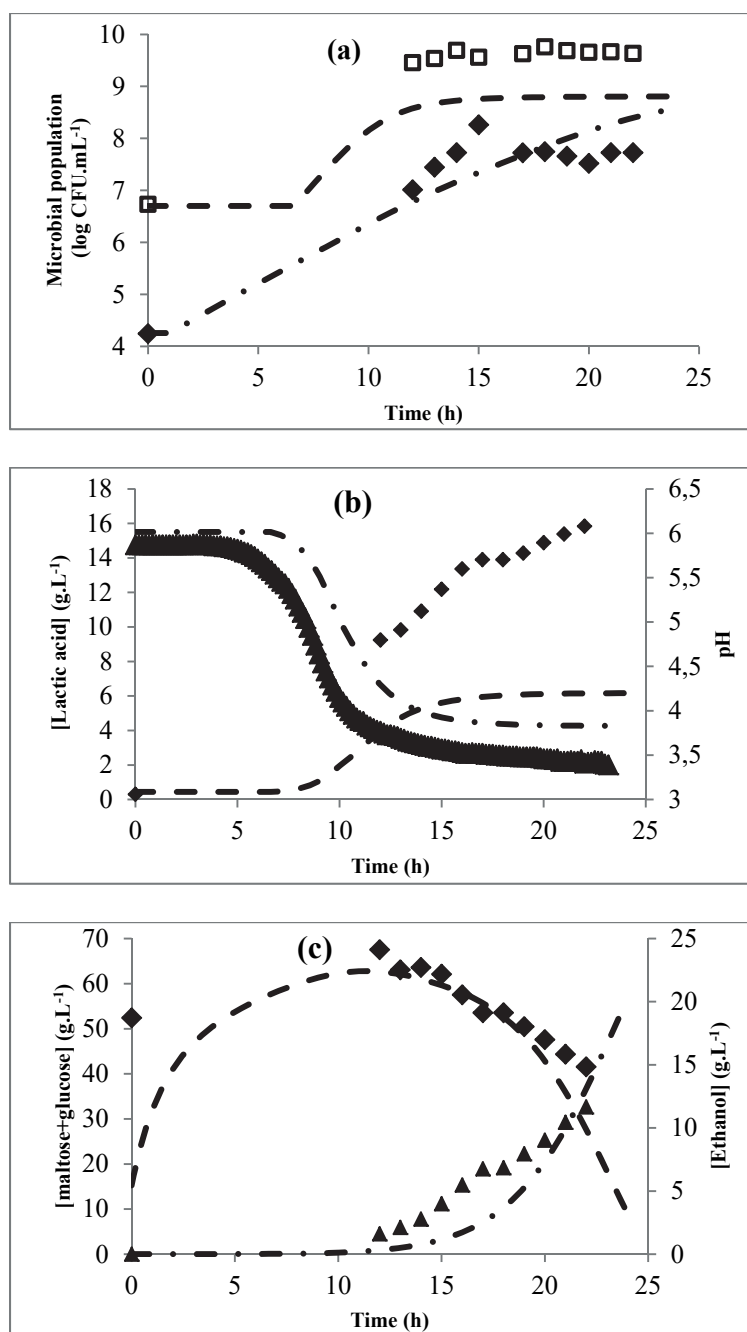


Figure 8: Figure 8: (a) Changes microbial population of *Lactobacillus plantarum* (□,- -) and *Pichia kluyveri* (◆, - -); (b) in pH (▲,- -) and lactic acid concentration (◆, - -); (c) maltose + glucose concentration (◆, - -) and ethanol (▲,- -), for validation test V2 (35°C, Lb 10⁶/ Pk 10⁴, P_{recook flour} 15g, F_{lour} 60g, P_{recook} 80°C). Experimental data (symbol) and predicted values (dashedlines)

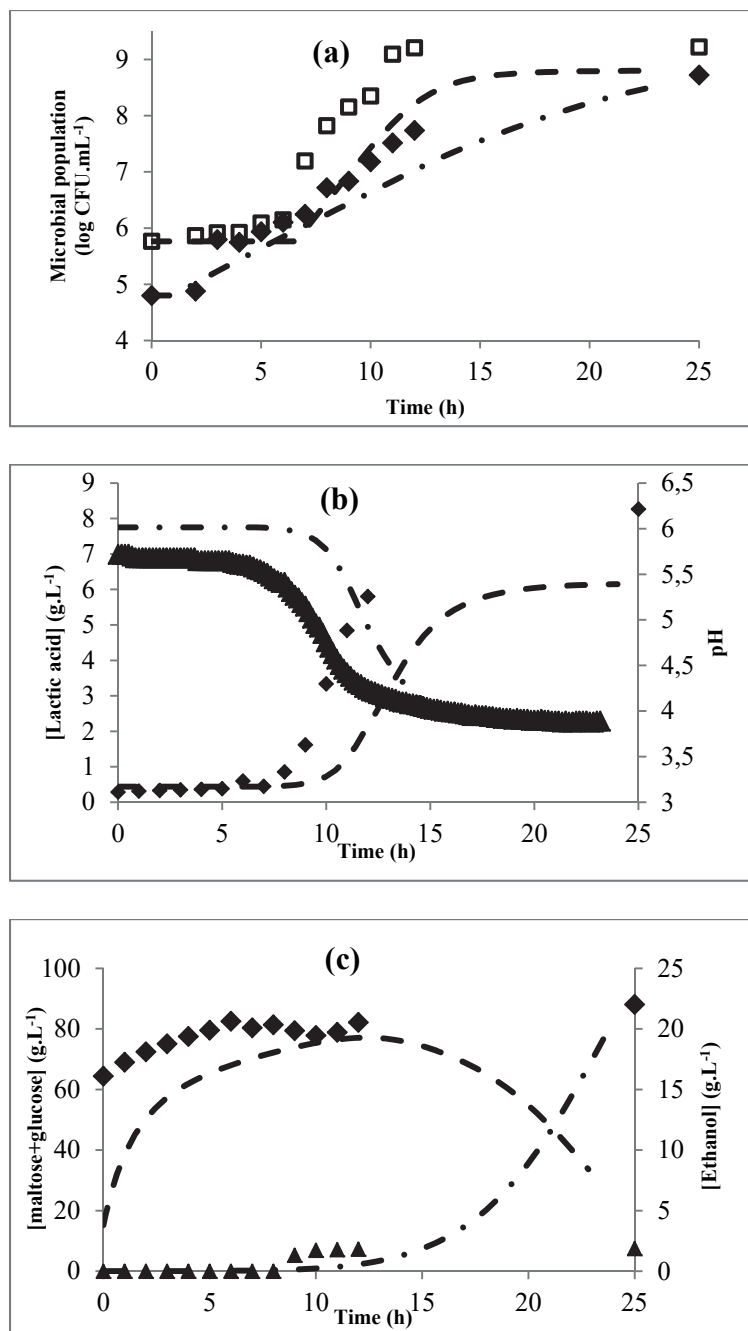


Figure 9: **(a)** Changes in microbial population of *Lactobacillus plantarum* (□,- -) and *Pichia kluyveri* (◆, -.-); **(b)** in pH (▲,-.-) and lactic acid concentration (◆, -.-); **(c)** maltose + glucose concentration (◆, -.-) and ethanol (▲,-.-) for validation test V3 (40°C, Lb 10⁵/ Pk 10⁴, P_{recook flour} 20g, F_{lour} 55g, P_{recook} 80°C). Experimental data (symbol) and predicted values (dashed lines)

The global model was used for two simulations (Table 3). They had in common a temperature of fermentation at 40°C and an initial mixture composed of 30 g of pre-cooked flour at 85 ° C and 45 g of uncooked flour. The amount of malt remains unchanged. Only the inoculum changes, in simulation S1, it is 10^5 CFU.mL⁻¹ for each of the two microbial strains and the other simulation S2, the lactic population is ten times greater. S2 simulation (figure 10) predicted a higher starch hydrolysis, with an amount of 92g.L⁻¹ of fermentable sugars, a short fermentation time (15 h) and a very low of ethanol concentration. In these fermenting conditions it possible to produce gowé with better sanitary safety and sensory characteristics.

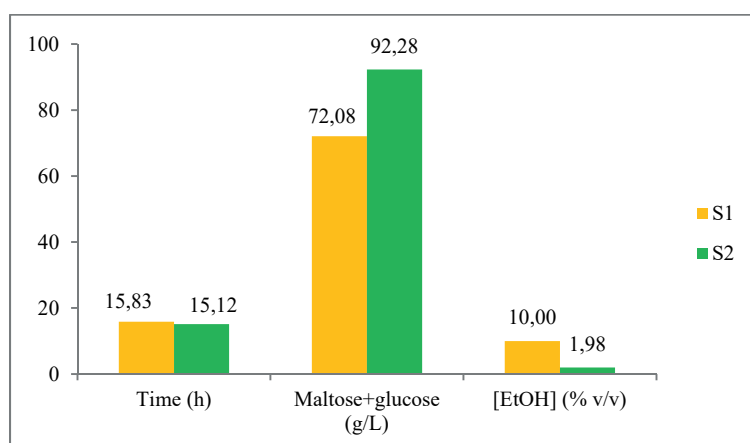


Figure 10: Results of simulation S1 (40°C, Lb 10^5 / Pk 10^5 , P_{recook flour} 35g, F_{lour} 45g, Pre_{cook} 85°C) and S2 (40°C, Lb 10^6 / Pk 10^5 , P_{recook flour} 35g, F_{lour} 45g, Pre_{cook} 85°C),

Conclusion

This work is the culmination of a step-by-step modelling approach using microbial growth models used in predictive microbiology to construct an overall model of gowé fermentation by integrating a model of lactic fermentation by a selected *Lactobacillus plantarum* strain, a model of the saccharification of starch by the amylase activity of the malt and the growth model of a selected *Pichia kluyveri* strain. The first step of this work was to build a growth model of the *Pichia kluyveri* strain, taken into account temperature, pH, ethanol, lactic acid and glucose concentration, as well as the conversion efficiency of glucose to ethanol and biomass. The second was to integrate into the growth model of the *Lactobacillus plantarum* strain the effect of ethanol concentration and glucose on its growth. Growth model of the *Pichia kluyveri* strain was validated in semi-synthetic medium and in the mixture used for gowé fermentation. The third step was to validate the global model build during gowé fermentations performed at the laboratory scale involving the selected strains of *Lactobacillus*

plantarum and *Pichia kluyveri*. The comparison of the experimental data with those predicted by the model reveals differences which do not seem to be related to the quality of the model developed which it appears already as a tool for predicting the quality of the final product according to the properties of each strain used, their respective population levels in the inoculum, the composition of the mixture, the parameters of the fermentation and these of precooking of the flour. The predictive quality of the model implies taking into account the amylase activity of sorghum flour and the possible interactions between lactic bacteria and yeasts. To avoid difficulties due to the presence of wild sorghum microflora in fermentations validating the model, it would be necessary to be able to dispose of sterile flour and malt. Otherwise, consideration should be given to carrying out the validations with a sterile synthetic medium of composition as close as possible to the mixture of malt and sorghum flour and having the same level of amylase activity.

References

- Antoce, A., Takahashi, K., and Namolosanu, I. (1996). Characterization of ethanol tolerance of yeasts using a calorimetric technique. *VITIS-J. Grapevine Res.* *35*, 105.
- Antoce, O.-A., Antoce, V., Takahashi, K., and Yoshizako, F. (1997). Quantitative Study of Yeast Growth in the Presence of Added Ethanol and Methanol Using a Calorimetric Approach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *61*, 664–669.
- Arroyo-López, F.N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., and Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *Int. J. Food Microbiol.* *128*, 189–196.
- Bayrock, D.P., and Ingledew, W.M. (2004). Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *31*, 362–368.
- Betts, G.D., Linton, P., and Betteridge, R.J. (1999). Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth. *Food Control* *10*, 27–33.
- Charalampopoulos, D., Vázquez, J.A., and Pandiella, S.S. (2009). Modelling and validation of *Lactobacillus plantarum* fermentations in cereal-based media with different sugar concentrations and buffering capacities. *Biochem. Eng. J.* *44*, 96–105.
- Cornu, M., Billoir, E., Bergis, H., Beaufort, A., and Zuliani, V. (2011). Modeling microbial competition in food: Application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. *Food Microbiol.* *28*, 639–647.
- Coroller, L., Guerrot, V., Huchet, V., Lemarc, Y., Mafart, P., Sohier, D., and Thuault, D. (2005). Modelling the influence of single acid and mixture on bacterial growth. *Int. J. Food Microbiol.* *100*, 167–178.
- De Levie, R. (2001). How to use Excel in analytical chemistry and in general scientific data analysis (Cambridge; New York: Cambridge University Press).
- De Man, J.C., Rogosa, deM, and Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* *23*, 130–135.
- De Vuyst, L., and Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Technol.* *16*, 43–56.
- De Vuyst, L., and Vandamme, E.J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In
- Delgenes, J.P., Moletta, R., and Navarro, J.M. (1988). The ethanol tolerance of *Pichia stipitis* Y 7124 grown on a D-xylose, D-glucose and L-arabinose mixture. *J. Ferment. Technol.* *66*, 417–422.
- Dens, E. J. and Van Impe, J. F. On the need for another type of predictive model in structured foods. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, vol. 64, no 3, p. 247-260.
- Dobrinevski, A., and Frey, E. (2012). Extinction in neutrally stable stochastic Lotka-Volterra models. *Phys. Rev. E* *85*, 051903.

- Du Preez, J.C. (1994). Process parameters and environmental factors affecting d-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* *16*, 944–956.
- G-Alegría, E., López, I., Ruiz, J.I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., and Ruiz-Larrea, F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol. Lett.* *230*, 53–61
- Gobbetti, M., Corsetti, A., and Rossi, J. (1994). The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *41*, 456–460.
- Helle, S., Cameron, D., Lam, J., White, B., and Duff, S. (2003). Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* *33*, 786–792.
- Hoppe, G.K. (1981). Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth. *Biotechnol Lett* (1982) *4*: 39.
- Kedia, G., Wang, R., Patel, H., and Pandiella, S.S. (2007). Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. *Process Biochem.* *42*, 65–70.
- Laplace, J.M., Delgenes, J.P., Moletta, R., and Navarro, J.M. (1991). Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: Process considerations in relation to ethanol tolerance. *Biotechnol. Lett.* *13*, 445–450.
- Leite, A.M. de O., Miguel, M.A.L., Peixoto, R.S., Rosado, A.S., Silva, J.T., and Paschoalin, V.M.F. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Braz. J. Microbiol.* *44*, 341–349.
- Liu, S., and Qureshi, N. (2009). How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotechnol.* *26*, 117–121.
- Lonvaud, A., Renouf, V., and Strehaiano, P. (2010). *Microbiologie du vin : bases fondamentales et applications*. Ed Tecdoc Lavoisier, Cachan, France.
- Mestres, C., Munanga, B.J.C., Loiseau, G., Matignon, B., Grabulos, J., and Achir, N. (2017). Modeling cereal starch hydrolysis during simultaneous saccharification and lactic acid fermentation; case of a sorghum-based fermented beverage, gowé. *Food Res. Int.* *100*, 102–111.
- Michelin, M., Silva, T.M., Benassi, V.M., Peixoto-Nogueira, S.C., Moraes, L.A.B., Leão, J.M., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., and Polizeli, M. de L.T.M. (2010). Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydr. Res.* *345*, 2348–2353.
- Munanga, B., Loiseau, G., Grabulos, J., and Mestres, C. (2016). Modeling lactic fermentation of Gowé using *Lactobacillus* starter culture. *Microorganisms* *4*, 44.

- Mussatto, S.I., Machado, E.M., Carneiro, L.M., and Teixeira, J.A. (2012). Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Appl. Energy* 92, 763–768.
- Praphailong, W., and Fleet, G.H. (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol.* 14, 459–468.
- Rosso, L. (1995). Modélisation et microbiologie prévisionnelle : Élaboration d'un nouvel outil pour l'Agro-alimentaire. Université Claude Bernard-Lyon I.
- Rosso, L., Lobry, J.R., and Flandrois, J.P. (1993). An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J. Theor. Biol.* 162, 447–463.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., and Flandrois, J.P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of Temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 610–616.
- Rouwenhorst, R.J., Visser, L.E., Van Der Baan, A.A., Scheffers, W.A., and Van Dijken, J.P. (1988). Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1131–1137.
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F.N., Barrio, E., Querol, A., and Guillamón, J.M. (2011). Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 1155–1161.
- Sharma, V., and Mishra, H.N. (2014). Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetable juices. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 1123–1128.
- Smid, E.J., and Lacroix, C. (2013). Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 148–154.
- Song, H., Jang, S.H., Park, J.M., and Lee, S.Y. (2008). Modeling of batch fermentation kinetics for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Biochem. Eng. J.* 40, 107–115.
- Thomas, K.C., Hynes, S.H., and Ingledew, W.M. (2002). Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1616–1623.
- Van Impe, J., Poschet, F., Geeraerd, A., and Vereecken, K. (2005). Towards a novel class of predictive microbial growth models. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 97–105.
- Viljoen, B.C. (2006). Yeast ecological interactions. Yeast–yeast, yeast–bacteria, yeast–fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. In yeasts in food and beverages, (Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag), pp. 83–110.
- Zwietering, M.H., Wiltjes, T., Rombouts, F.M., and Van't Riet, K. (1993). A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods. *J. Ind. Microbiol.* 12, 324–329.

4 Conclusion générale et perspectives

Dans les pays du sud sont consommés quotidiennement des aliments fermentés à base de céréale qui ne sont pas toujours sains et dont la qualité sensorielle ne rencontre pas toujours l'attente des consommateurs. Le recours à des starters microbiens est une voie importante pour maîtriser la qualité des aliments fermentés qui devront être produits à grande échelle pour accompagner l'augmentation des populations concentrées dans les centres urbains. Le choix des souches présentes seules ou en association dans un starter et la détermination des conditions de leur utilisation est un processus long et coûteux. Dans ce contexte, disposer d'un outil facile à mettre en œuvre pour faciliter le choix et l'utilisation de starter microbiens capables de conduire la fermentation d'aliments céréalier constituerait une avancée indéniable. L'objectif, de ce travail, va dans ce sens, il a pour objectif principal, de proposer un modèle global de la fermentation du Gowé, une boisson fermentée à base de farine et de malt de sorgho devant permettre le choix de starters adaptés, la détermination des conditions de leur utilisation et les paramètres de conduite de la fermentation en relation avec la qualité finale de l'aliment fermenté. Le choix du Gowé a été dicté par la complexité de son processus de fabrication qui associe le développement de deux flores microbiennes différentes soit des bactéries lactique et des levures. Développement assuré par la fourniture de glucides fermentescibles due à l'hydrolyse de l'amidon catalysée par l'activité amylasique du malt de sorgho.

Comme tous les modèles, celui-ci doit être une représentation partielle du fonctionnement d'un système qui ne représente que les processus et variables considérés pertinents et généralisables. C'est pourquoi, la stratégie de modélisation utilisée pour ce travail, prend en compte les réactions biochimiques (amylolyse) et biologiques (croissances microbiennes) présentées dans la figure 1, dont le bon déroulement détermine l'élaboration de la qualité du gowé.

La stratégie de modélisation a privilégié une approche modulaire pas à pas qui a permis de construire le modèle global en agrégeant le modèle de croissance de souches de bactéries lactique et d'une levure commercialisées, à un modèle d'hydrolyse de l'amidon. Le choix a été fait d'utiliser des modèles largement utilisés en microbiologie prédictive pour leur simplicité de leur mise en œuvre et leur capacité à déterminer les paramètres de croissance unanimement reconnus pour leur signification biologique. C'est pourquoi, notre démarche de modélisation a mobilisé le modèle primaire de Rosso *et al.*, (1993) et le gamma concept développé par (Zwietering *et al.* 1992) basé sur une approche progressive, consistant à étudier et à modéliser séparément l'impact de chaque facteur environnemental puis à construire à en

Conclusion générale et perspectives

combinant ces modules simples, un modèle général complet incluant l'effet de tous les facteurs

Le travail a été initié en réalisant des fermentations en milieu synthétique pour déterminer les différents paramètres cinétiques des souches utilisées qui ont permis d'alimenter le modèle de croissance de chacune des souches microbiennes utilisées. Des fermentations de gowé réalisées à l'échelle du laboratoire, soit un volume total de 300mL, ont été réalisées selon différentes conditions de pH, température, niveau d'inoculation et composition du mélange malt et farine de sorgho décontaminés par irradiation pour confronter les données expérimentales et celles prédites par les modèles de croissance en souche pure ou en mélange afin de valider les modèles. Lors de ce travail, a aussi été modélisée l'activité amylasique responsable de la production de maltose et de glucose lors de la fermentation en relation avec les conditions de précuisson d'une partie de la farine de sorgho du mélange avant fermentation. Finalement, le modèle global de la fermentation a été construit, il ne prévoyait pas la prise en compte d'interactions entre la population de bactéries lactiques et celle de levures. Le logiciel Simulink (Matlab) qui permet la modélisation de systèmes dynamiques a été utilisé pour implémenter les différents modèles.

A chacune des étapes de modélisation des difficultés ont été identifiées qui sans remettre en cause la pertinence du modèle global à bien décrire la fermentation du gowé méritent d'être surmontées pour en affiner la capacité à bien la décrire et augmenter la qualité de ces prévisions. La première difficulté identifiée est celle de la bonne détermination de la durée de la phase de croissance en particulier celle des souches lactiques utilisées. Le fait de ne pouvoir disposer de starter à haute densité de population viable, allonge artificiellement la durée de la phase de latence qui dépend alors du seuil de mesure de la population. Dans nos expérimentations ce seuil était trop élevé. La seconde difficulté concerne la réalisation des fermentations de validation des différents modèles de croissance. Le choix de faire les validations avec de la farine et du malt décontaminés par irradiation était fondé mais le niveau d'irradiation de ces deux produits a résulté d'un compromis entre la préservation de l'activité amylasique du malt et la décontamination des produits. Dans ces conditions, l'irradiation n'as pas permis de détruire complètement la microflore sauvage qui a interféré avec les souches sélectionnées quand celles-ci étaient inoculées à des niveaux trop bas. Les méthodes de dénombrement par comptage sur milieu MRS pour les bactéries lactiques et sur milieu Glucosé gélosé au chloramphénicol pour les levures ne permettaient pas de différencier les souches sauvages des souches inoculées. L'utilisation de méthodes moléculaires pour vérifier l'implantation majoritaire des souches sélectionnées, initialement envisagée n'as pas été

Conclusion générale et perspectives

réalisée par manque de temps et de données pertinentes permettant d'utiliser des amorces spécifiques des souches sélectionnées. Une solution aurait été de réaliser les fermentations de validation dans un milieu semi synthétique stérile, de composition aussi semblable que possible que celle du mélange farine et malt de sorgho y compris l'activité amylasique et la concentration en amidon gélatinisé soluble. La dernière difficulté concerne l'absence de prise en compte de l'activité amylasique de la farine de sorgho qui produit du maltose et du glucose à un niveau non négligeable quand la température de précuisson de la farine est augmentée et quand elle est ajoutée au mélange en plus grande proportion.

Globalement, le modèle permet de décrire la fermentation du gowé et de simuler différentes conditions de conduite de cette fermentation, ce qui a permis d'aboutir à une meilleure compréhension du déroulement de la fermentation du gowé et d'identifier les principaux leviers qu'il faut activer pour conduire à un gowé de qualité attendue à savoir : la température de précuisson de la farine et la quantité de celle-ci incorporée au mélange initial ainsi que la température de la fermentation. Se posent la question de l'utilité de prendre en compte les activités amylasiques du sorgho ou du malt qui conduisent à augmenter la concentration en maltose et glucose au-delà des prévisions du modèle.

Les fermentations de validation et les simulations ont montré l'importance du niveau d'inoculation du mélange initial avec les starters pour qu'ils colonisent majoritairement le milieu et conduisent la fermentation. La réponse à cette question dépend du niveau des populations sauvages et de leur adaptation aux conditions de la fermentation ce qui met l'accent sur la nécessité de maîtriser l'hygiène du procédé de fabrication pour limiter la présence de ces populations en absence de procédé facile à mettre en œuvre dans le contexte des pays du sud. Le niveau d'inoculation de la souche de *Lactobacillus plantarum* semble ne devoir pas être inférieur à 10^6 CFU.g⁻¹ et celui de la souche de *Pichia kluyveri* dix fois moindre.

Les perspectives de poursuite de ce travail sont nombreuses. Parmi les plus intéressantes, citons celles relatives à la possible existence d'interactions entre la souche de *Pichia kluyveri* et la souche de *Lactobacillus plantarum*. Ce serait la possibilité de savoir si ce type d'interactions existe. Dans l'affirmative, d'en déterminer les bases et enfin de savoir prendre en compte ces interactions dans le modèle global. Une autre perspective, serait de prendre en compte dans le modèle l'effet de la fermentation sur la viscosité du gowé qui est un attribut essentiel de la qualité du gowé.

5 Références bibliographiques

- Adebayo, C.O., Aderiye, B.I., and Akpor, O.B. (2013). Occurrence and antimicrobial properties of lactic acid bacteria during the fermentation of cassava mash, maize and sorghum grains. *Microbiol. Res. Int.* 1, 27–32.
- Adeyemo, S.M., and Onilude, A.A. (2013). Enzymatic Reduction of Anti-nutritional Factors in Fermenting Soybeans by Isolates from Fermenting Cereals. *Niger. Food J.* 31, 84–90.
- Adinsi, L., Vieira-Dalode, G., Akissoe, N., Anihouvi, V., Mestres, C., Jacobs, A., Dlamini, N., Pallet, D., and Hounhouigan, D.J. (2014). Processing and quality attributes of gowe: a malted and fermented cereal-based beverage from Benin. *Food Chain* 4, 171–183.
- Adinsi, L., Akissoé, N.H., Dalodé-Vieira, G., Anihouvi, V.B., Fliedel, G., Mestres, C., and Hounhouigan, J.D. (2015). Sensory evaluation and consumer acceptability of a beverage made from malted and fermented cereal: case of gowe from Benin. *Food Sci. Nutr.* 3, 1–9.
- Agu, R.C., and Palmer, G.H. (1996). Enzymic breakdown of endosperm proteins of sorghum at different malting temperatures. *J. Inst. Brew.* 102, 415–418.
- Agu, R.C., and Palmer, G.H. (1998). A reassessment of sorghum for lager-beer brewing. *Bioresour. Technol.* 66, 253–261.
- Ajerio, K.O., Booer, C.D., and Proudlove, M.O. (1993). Aspects of the malting of sorghum. *Ferment* 6, 339–341.
- Aka, S., Konan, G., Fokou, G., Dje, K.M., and Bonfoh, B. (2014). Review on African traditional cereal beverages. *Am. J. Res. Commun.* 2, 104–153.
- Amoa-Awua, W.K.A., Appoh, F.E., and Jakobsen, M. (1996). Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 87–98.
- Anfang, N., Brajkovich, M., and Goddard, M.R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15, 1–8.
- Angelov, M., Kostov, G., Simova, E., Beshkova, D., and Koprinkova-Hristova, P. (2009). Proto-cooperation factors in yogurt starter cultures.
- Anihouvi, V., Kindossi, J., and Hounhouigan, J. (2012). Processing and quality characteristics of some major fermented fish products from Africa: a critical review. *Int Res J Biol Sci* 1, 72–84.
- Antoce, A., Takahashi, K., and Namolosanu, I. (1996). Characterization of ethanol tolerance of yeasts using a calorimetric technique. *VITIS-J. Grapevine Res.* 35, 105.
- Antoce, O.-A., Antoce, V., Takahashi, K., and Yoshizako, F. (1997). Quantitative Study of Yeast Growth in the Presence of Added Ethanol and Methanol Using a Calorimetric Approach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 664–669.
- Apar, D.K., and Özbek, B. (2007). Estimation of Kinetic Parameters for Rice Starch Hydrolysis Inhibited by Added Materials. *Chem. Eng. Commun.* 194, 334–344.

Références bibliographiques

- Arroyo-López, F.N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., and Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *Int. J. Food Microbiol.* *128*, 189–196.
- Aryani, D.C., Den Besten, H.M.W., and Zwietering, M.H. (2016). Quantifying variability in growth and thermal inactivation kinetics of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* *82*, 4896–4908.
- Assanvo, J.B., Agbo, G.N., Coulin, P., Monsan, V., Heuberger, C., Kati-Coulibaly, S., and Farah, Z. (2017). Influence of microbiological and chemical quality of traditional starter made from cassava on “attiéké” produced from four cassava varieties. *Food Control* *78*, 286–296.
- Bai, F.W., Anderson, W.A., and Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* *26*, 89–105.
- Bakker, B.M., Overkamp, K.M., and Van Maris, A.J.A. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* *25*, 15–37.
- Baranyi, J., and Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* *23*, 277–294.
- Baranyi, J., Ross, T., McMeekin, T.A., and Roberts, T.A. (1996). Effects of parameterization on the performance of empirical models used in ‘predictive microbiology’. *Food Microbiol.* *13*, 83–91.
- Barnett, J.A. (1992). The taxonomy of the genus *Saccharomyces meyen ex Reess*: a short review for non-taxonomists. *Yeast* *8*, 1–23.
- Bayrock, D.P., and Ingledew, W.M. (2004). Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *31*, 362–368.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., and Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J. Ferment. Bioeng.* *70*, 246–252.
- Betts, G.D., Linton, P., and Betteridge, R.J. (1999). Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth. *Food Control* *10*, 27–33.
- Bezerra-Bussoli, C., Baffi, M.A., Gomes, E., and Da-Silva, R. (2013). Yeast diversity isolated from grape musts during spontaneous fermentation from a Brazilian winery. *Curr. Microbiol.* *67*, 356–361.
- Bialas, W., Czerniak, A., and Szymanowska-Powalowska, D. (2014). Kinetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation of corn starch for ethanol production. *Acta Biochim Pol* *61*, 153–162.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M., E., Pandiella, S., S., Cantero, D., and Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* *36*, 527–543.
- Boitard, L. (2010). Mesure du métabolisme de la levure par flux osmotiques entre gouttes d’émulsion. Thèse de doctorat, Université Paris-Diderot-Paris VII.

Références bibliographiques

- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., et al. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int J Food Microbiol* 154, 87–97.
- Broach, J.R. (2012). Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. *Genetics* 192, 73–105.
- Buchanan, R.E. (1918). Life phases in a bacterial culture. *J. Infect. Dis.* 109–125.
- Buchanan, R., and Solberg, M. (1972). Interaction of sodium nitrate, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.* 37, 81–85.
- Buchanan, R.L., and Cygnarowicz, M.L. (1990). A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. *Food Microbiol.* 7, 237–240.
- Cagniard de la Tour, C. (1837). Mémoire sur la fermentation vineuse. *C R Acad Sci* 4, 905–906.
- Campbell-Platt, G. (1995). Fermented meats—a world perspective. In *Fermented Meats*, (USA: Springer), pp. 39–52.
- Carmelo, V., Santos, H., and Sá-Correia, I. (1997). Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.* 1325, 63–70.
- Carrau, F.M., Medina, K., and Farina, L. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res.* 8, 1196–1207.
- Charalampopoulos, D., Vázquez, J.A., and Pandiella, S.S. (2009). Modelling and validation of *Lactobacillus plantarum* fermentations in cereal-based media with different sugar concentrations and buffering capacities. *Biochem. Eng. J.* 44, 96–105.
- Cheng, H. (2010). Volatile flavor compounds in yogurt: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50, 938–950.
- Ciani, M., and Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 199–203.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Smidt, S., Henschke, P.A., Curtin, C., and Varela, C. (2015). The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *Int. J. Food Microbiol.* 7–15, 7–15.
- Corn, M. (2010). Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes. Thèse de Doctorat. , Université Claude Bernard-Lyon 1.
- Cornu, M., Billoir, E., Bergis, H., Beaufort, A., and Zuliani, V. (2011). Modeling microbial competition in food: Application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. *Food Microbiol.* 28, 639–647.

Références bibliographiques

- Coroller, L., Guerrot, V., Huchet, V., Lemarc, Y., Mafart, P., Sohier, D., and Thuault, D. (2005). Modelling the influence of single acid and mixture on bacterial growth. *Int. J. Food Microbiol.* *100*, 167–178.
- Corrieu, G., and Luquet, F.-M. (2008). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments* Ed Lavoisier, Cachan, France.
- Couto, M.M.B., Reizinho, R.G., and Duarte, F.L. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* *102*, 49–56.
- Crafack, M., Mikkelsen, M.B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., Takrama, J., Swiegers, J.H., Petersen, G.B., Heimdal, H., et al. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* *167*, 103–111.
- Davis, R.A. (2008). Parameter estimation for simultaneous saccharification and fermentation of food waste into ethanol using Matlab Simulink. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *147*, 11–21.
- De Levie, R. (2001). *How to use Excel in analytical chemistry and in general scientific data analysis* (Cambridge; New York: Cambridge University Press).
- De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* *23*, 130–135.
- De Vuyst, L., and Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Technol.* *16*, 43–56.
- De Vuyst, L., and Vandamme, E.J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, (springer US), pp. 91–142.
- Delgenes, J.P., Moletta, R., and Navarro, J.M. (1988). The ethanol tolerance of *Pichia stipitis* Y 7124 grown on a D-xylose, D-glucose and L-arabinose mixture. *J. Ferment. Technol.* *66*, 417–422.
- Desmazeaud, M.J., and Roissart, H. (1994). *Métabolisme général des bactéries lactiques*. In *Bactéries Lactiques* Ed Loriga, Uriage-France, pp. 169–207.
- Dewar, J., Taylor, J.R.N., and Berjak, P. (1997). Effect of germination conditions, with optimised steeping, on sorghum malt quality—with particular reference to free amino nitrogen. *J. Inst. Brew.* *103*, 171–175.
- Dicko, M.H., Gruppen, H., Traoré, A.S., Voragen, A.G., and Van Berkel, W.J. (2006). Review: sorghum grain as human food in Africa: relevance of starch content and amylase activities. *Afr. J. Biotechnol.* *5*, 384–395.
- Dobrinevski, A., and Frey, E. (2012). Extinction in neutrally stable stochastic Lotka-Volterra models. *Phys. Rev. E* *85*, 051903.
- Du Preez, J.C. (1994). Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* *16*, 944–956.

Références bibliographiques

- Dziedzoave, N.T., Graffham, A.J., Westby, A., and Komlaga, G. (2010). Comparative assessment of amylolytic and cellulolytic enzyme activity of malts prepared from tropical cereals. *Food Control* 21, 1349–1353.
- El Hajji, M. (2010). Modélisation et analyse mathématiques pour les écosystèmes microbiens: approche par les systèmes dynamiques. Thèse de doctorat, Université Montpellier 2.
- Elmaki, H.B., Babiker, E.E., and El Tinay, A.H. (1999). Changes in chemical composition, grain malting, starch and tannin contents and protein digestibility during germination of sorghum cultivars. *Food Chem.* 64, 331–336.
- Estela-Escalante, W., Rychtera, M., Melzoch, K., and Hatta-Sakoda, B. (2012). Effect of aeration on the fermentative activity of *saccharomyces cerevisiae* cultured in apple juice. *rev. mex. ing. quím.* 11, 211–226.
- Ezeogu, L.I., and Okolo, B.N. (1995). Effects of air rest periods on malting sorghum response to final warm water steep. *J. Inst. Brew.* 101, 39–45.
- Fahimi, N. (2012). Étude des interactions entre bactéries lactiques et eonologiques *Oenococcus oeni*. Analyses cinétiques et modélisation.
- FAO (2002). World agriculture: towards 2015/2030: summary report. (Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations).
- Fraleigh, S., Bungay, H., and Fiechter, A. (1989). Regulation of oxidoreductive yeast metabolism by extracellular factors. *J. Biotechnol.* 12, 185–198.
- Fu, W., and Mathews, A.P. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochem. Eng. J.* 3, 163–170.
- Fukuhara, H. (2003). The Kluyver effect revisited. *FEMS Yeast Res.* 3, 327–331.
- G-Alegría, E., López, I., Ruiz, J.I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., and Ruiz-Larrea, F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 53–61.
- Gaspar, P., Carvalho, A.L., Vinga, S., Santos, H., and Neves, A.R. (2013). From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* 31, 764–788.
- Gay-Lussac, J.L. (1810). Extrait d'un mémoire sur la fermentation. *Ann Chim.* 76, 245–259.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., and Rossi, J. (1994). The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 456–460.
- Goffin, P., Deghorain, M., Mainardi, J.-L., Tytgat, I., Champomier-Vergès, M.-C., Kleerebezem, M., and Hols, P. (2005). Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 187, 6750–6761.

Références bibliographiques

- Graves, T., Narendranath, N.V., Dawson, K., and Power, R. (2006). Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *33*, 469.
- Halász, A. (2009). Lactic acid bacteria. *Food Qual. Stand.* *3*, 70–82.
- Hampikyan, H. (2009). Efficacy of nisin against *Staphylococcus aureus* in experimentally contaminated sucuk, a Turkish-type fermented sausage. *J. Food Prot.* *72*, 1739–1743.
- Helle, S., Cameron, D., Lam, J., White, B., and Duff, S. (2003). Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* *33*, 786–792.
- Hoppe, G.K. (1981). Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth. University of Cape Town.
- Huberts, D.H.E.W., Niebel, B., and Heinemann, M. (2012). A flux-sensing mechanism could regulate the switch between respiration and fermentation. *FEMS Yeast Res.* *12*, 118–128.
- Huet, S., Jolivet, E., and Messéan, A. (1992). La régression non-linéaire: méthodes et applications en biologie ed INRA, Paris France.
- Hugenholtz, J., and Smid, E.J. (2002). Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* *13*, 497–507.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A., and Rozès, N. (2008). Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Res. Int.* *41*, 738–744.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., and Rozès, N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiol.* *31*, 1–8.
- Ikenebomeh, M.J., Kok, R., and Ingram, J.M. (1986). Processing and fermentation of the African locust bean (*Parkia filicoidea* Welw.) to produce dawadawa. *J. Sci. Food Agric.* *37*, 273–282.
- Jespersen, L., Nielsen, D.S., Hønholt, S., and Jakobsen, M. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Res.* *5*, 441–453.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* *49*, 209–224.
- Kayodé, A.P.P., Adegbidi, A., Hounhouigan, J. D., Linnemann, A. R., and Robert Nout, M.J. (2005). Quality of farmers' varieties of sorghum and derived foods as perceived by consumers in Benin. *Ecol. Food Nutr.* *44*, 271–294.
- Kedia, G., Wang, R., Patel, H., and Pandiella, S. S. (2007). Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. *Process Biochem.* *42*, 65–70.

Références bibliographiques

- Kelkar, S., and Dolan, K. (2012). Modeling the effects of initial nitrogen content and temperature on fermentation kinetics of hard cider. *J. Food Eng.* *109*, 588–596.
- Khedid, K., Faid, M., and Mokhtari, A. (2009). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol. Res.* *164*, 81–91.
- Kim, D.-K., Park, J.M., Song, H., and Chang, Y.K. (2016). Kinetic modeling of substrate and product inhibition for 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. *Biochem. Eng. J.* *114*, 94–100.
- Kurtzman, T., and Cletus, P. (2011). Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* *99*, 13–23.
- Kutzing, F. (1837). Microscopische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter, nebst mehreren andern dazu gehorigen vegetabilischen Gebilden. *J Prakt Chem* *11*, 385–409.
- Laderman, K.A., Davis, B.R., Krutzsch, H.C., Lewis, M.S., Griko, Y.V., Privalov, P.L., and Anfinsen, C.B. (1993). The purification and characterization of an extremely thermostable alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* *268*, 24394–24401.
- Lagunas, R. (1986). Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *2*, 221–228.
- Laplace, J. M., Delgenes, J. P., Moletta, R., and Navarro, J. M. (1991). Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: Process considerations in relation to ethanol tolerance. *Biotechnol. Lett.* *13*, 445–450.
- Lavoisier, A. L. (1789). *Traité Élémentaire de Chimie, présenté dans un ordre nouveau et d'après les découvertes récentes, avec Figures* (Cuchet Paris).
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., and Thuault, D. (2002). Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *Int. J. Food Microbiol.* *73*, 219–237.
- Lebert, I., and Lebert, A. (2006). Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling approach: a review. *Int. J. Refrig.* *29*, 968–984.
- Lebert, I., Robles-Olvera, A., and Lebert, A. (2000). Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas spp.* and *Listeria* in meat. *Int. J. Food Microbiol.* *61*, 27–39.
- Lechardeur, D., Cesselin, B., Fernandez, A., Lamberet, G., Garrigues, C., Pedersen, M., Gaudu, P., and Gruss, A. (2011). Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol* *22*, 143–149.
- Ledesma, O. V., Ruiz Holgado, A. P., and Oliver, G. (1997). A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* *42*, 123–133.
- Leite, A. M. de O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., and Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Braz. J. Microbiol.* *44*, 341–349.

- Lister, J. B. (1873). A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes (JE Allard).
- Liu, S., and Qureshi, N. (2009). How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotechnol.* *26*, 117–121.
- Liu, S., Li, C., Xie, L., and Cao, Z. (2003). Intracellular pH and metabolic activity of long-chain dicarboxylic acid-producing yeast *Candida tropicalis*. *J. Biosci. Bioeng.* *96*, 349–353.
- Lobry, J. R. (1991). Ré-évaluation du modèle de croissance de Monod. Effet des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon I.
- Lonvaud, A., Renouf, V., and Strehaiano, P. (2010). *Microbiologie du vin : bases fondamentales et applications*. Ed Tecdoc Lavoisier, Cachan, France.
- Lorri, W., and Svanberg, U. (1993). Lactic-fermented cereal gruels with improved *in vitro* protein digestibility. *Int. J. Food Sci. Nutr.* *44*, 29–36.
- Luedeking, R., and Piret, E. L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* *1*, 393–412.
- Makarova, A. K. S., and Koonin, E. V. (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* *189*, 1199–1208.
- Marshall, E., and Mejía-Lorío, D. (2011). Traditional fermented food and beverages for improved livelihoods (Rome: Rural Infrastructure and Agro-Industries Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations).
- Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., and Vidal-Valverde, C. (2008). Alpha-galactosides: antinutritional factors or functional ingredients? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *48*, 301–316.
- Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J., and Dubourdieu, D. (1998). New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl. Environ. Microbiol.* *64*, 3887–3892.
- Masoud, W., Bjørg, C.L., Jespersen, L., and Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast* *21*, 549–556.
- Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E.A., and Pessione, E. (2014). Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnol. Adv.* *32*, 1216–1236.
- McKevith, B. (2004). Nutritional aspects of cereals. *Nutr. Bull.* *29*, 111–142.
- Mestres, C., Nguyen, The C., Adinsi, L., Hounhouigan, J., Fliedel, G., and Loiseau, G. (2015). The interaction between starch hydrolysis and acidification kinetic determines the quality of a malted and fermented sorghum beverage. *J. Cereal Sci.* *63*, 8–13.
- Mestres, C., Munanga, B.J.C., Loiseau, G., Matignon, B., Grabulos, J., and Achir, N. (2017). Modeling cereal starch hydrolysis during simultaneous saccharification and lactic acid fermentation; case of a sorghum-based fermented beverage, gowé. *Food Res. Int.* *100*, 102–111.

Références bibliographiques

- Michelin, M., Silva, T.M., Benassi, V.M., Peixoto-Nogueira, S.C., Moraes, L.A.B., Leão, J.M., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., and Polizeli, M. de L.T.M. (2010). Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydr. Res.* *345*, 2348–2353.
- Michodjèhoun-Mestres, L., Joseph, H., Joseph, D., and Christian, M. (2005). Physical, chemical and microbiological changes during natural fermentation of “gowé”, a sprouted or non sprouted sorghum beverage from West-Africa. *Afr. J. Biotechnol.* *4*, 487–496.
- Mokoena, M.P., Chelule, P.K., and Gqaleni, N. (2006). The toxicity and decreased concentration of aflatoxin B1 in natural lactic acid fermented maize meal. *J. Appl. Microbiol.* *100*, 773–777.
- Mollapour, M., and Piper, P.W. (2006). Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* *6*, 1274–1280.
- Monod, J. (1941). Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Thèse de docteur ès sciences naturelles, Université de Paris.
- Monteagudo, J.M., Rodríguez, L., Rincón, J., and Fuertes, J. (1994). Optimization of the conditions of the fermentation of beet molasses to lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii*. *Acta Biotechnol.* *14*, 251–260.
- Morais, P. B., Rosa, C. A., Linardi, V. R., Pataro, C., and Maia, A. B. R. A. (1997). Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *13*, 241–243.
- Moulin, G., Boze, H., and Galzy, P. (1980). Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* *22*, 2375–2381.
- Mounier, J., Monnet, C., Vallaey, T., Arditi, R., Sarthou, A. S., Hélias, A., and Irlinger, F. (2008). Microbial interactions within a cheese microbial community. *Appl. Environmental Microbiology*, *74*, 172-181.
- Munanga, B., Loiseau, G., Grabulos, J., and Mestres, C. (2016). Modeling lactic fermentation of Gowé using *Lactobacillus* starter culture. *Microorganisms* *4*, 44.
- Muralikrishna, G., and Nirmala, M. (2005). Cereal α -amylases-an overview. *Carbohydr. Polym.* *60*, 163–173.
- Mussatto, S.I., Machado, E.M., Carneiro, L.M., and Teixeira, J.A. (2012). Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Appl. Energy* *92*, 763–768.
- Mutukumira, A.N., Narvhus, J.A., and Abrahamsen, R.K. (1995). Review of traditionally-fermented milk in some sub-Saharan countries: focusing on Zimbabwe. *Cult. Dairy Prod. J.*
- Najafi, M.F., Deobagkar, D., and Deobagkar, D. (2005). Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expr. Purif.* *41*, 349–354.

Références bibliographiques

- Nardi, T., Carlot, M., De Bortoli, E., Corich, V., and Giacomini, A. (2006). A rapid method for differentiating *Saccharomyces sensu stricto* strains from other yeast species in an enological environment. *FEMS Microbiol. Lett.* *264*, 168–173.
- Narendranath, N.V., and Power, R. (2005). Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 2239–2243.
- Narendranath, N.V., Thomas, K.C., and Ingledew, W.M. (2001). Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *26*, 171–177.
- Nehme, N. (2008). Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* : impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. Thèse de doctorat Université de Toulouse.
- N'guessan, K.F., Brou, K., Jacques, N., Casaregola, S., and Dje, K.M. (2011). Identification of yeasts during alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire. *Antonie Van Leeuwenhoek* *99*, 855–864.
- Nissen, P., Nielsen, D., and Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* *20*, 331–341.
- Nosek, J., and Fukuhara, H. (1994). NADH dehydrogenase subunit genes in the mitochondrial DNA of yeasts. *J. Bacteriol.* *176*, 5622–5630.
- Nout, M.J.R., and Motarjemi, Y. (1997). Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety: a joint FAO/WHO workshop. *Food Control* *8*, 221–226.
- Nyanga, L.K., Nout, M.J., Gadaga, T.H., Theelen, B., Boekhout, T., and Zwietering, M.H. (2007). Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. *Int. J. Food Microbiol.* *120*, 159–166.
- Ogu, E.O., Odibo, F.J.C., Agu, R.C., and Palmer, G.H. (2006). Quality assessment of different sorghum varieties for their brewing potential. *J. Inst. Brew.* *112*, 117–121.
- Osorio-Cadauid, E., Chaves-López, C., Tofalo, R., Paparella, A., and Suzzi, G. (2008). Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiol.* *25*, 771–777.
- Oyewole, O.A., and Isah, P. (2012). Locally fermented foods in Nigeria and their significance to national economy: A review. *J Recent Adv Agric* *1*, 92–102.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., and Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 135–52.
- Pasteur, L. (1857a). Mémoire sur la fermentation appelée lactique, *C R Acad Sci*.
- Pasteur, L. (1857b). Mémoire sur la fermentation alcoolique. *C R Acad Sci* *45*, 1032–1036.

Références bibliographiques

- Pfeiffer, T., and Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front. Mol. Biosci.* *1*.
- Pinto, M.G.V., Franz, C.M.A.P., and Schillinger, U. (2006). *Lactobacillus spp.* with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* *109*, 205–214.
- Pirt, S.J. (1975). Principles of microbe and cell cultivation. (Blackwell Scientific Publications.).
- Podolak, P.K., Zayas, J.F., Kastner, C.L., and Fung, D.Y.C. (1996). inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* *59*, 370–373.
- Polonelli, L., and Morace, G. (1986). Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J. Clin. Microbiol.* *24*, 866–869.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R. (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* *57*, 543–594.
- Prajapati, J.B., and Nair, B.M. (2003). The history of fermented foods. In *Fermented Functional Foods*, (Boca Raton, New York, London, Washington DC: CRC Press), pp. 1–25.
- Praphailong, W., and Fleet, G.H. (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol.* *14*, 459–468.
- Presečki, A.V., Findrik, Z., and Vasic-Racki, D. (2013). Mathematical modeling of maize starch liquefaction catalyzed by α -amylases from *Bacillus licheniformis*: Effect of calcium, pH and temperature. *Bioprocess Biosyst Eng* *36*, 117–126.
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., and Kumar, E.V. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. *Biotechnol. Adv.* *26*, 22–34.
- Reddy, N.S., Nimmagadda, A., and Naveena, K.R.S.S. (2004). An overview of the microbial α -amylase family. *Biotechnol. Adv.* *26*, 22–34.
- Reed, G. (2012). *Yeast technology* (Springer Science & Business Media).
- Riba, J.-P. (1998). Réacteurs enzymatiques et fermenteurs. *Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire* *2*, 1–23.
- Ringø, E., and Gatesoupe, F.-J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* *160*, 177–203.
- Rodrigues, F., Ludovico, P., and Leão, C. (2006). Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, (Springer), pp. 101–121.
- Rolland, F., Winderickx, J., and Thevelein, J.M. (2002). Glucose-sensing and-signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* *2*, 183–201.

Références bibliographiques

- Ross, R.P., Morgan, S., and Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* *79*, 3–16.
- Rosso, L. (1995). Modélisation et microbiologie prévisionnelle : Élaboration d'un nouvel outil pour l'Agro-alimentaire. Université Claude Bernard-Lyon I.
- Rosso, L., Lobry, J.R., and Flandrois, J.P. (1993). An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J. Theor. Biol.* *162*, 447–463.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., and Flandrois, J.P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* *61*, 610–616.
- Rousseau, S., and Doneche, B. (2001). Effects of water activity. *Vitis* *40*, 75–78.
- Rouwenhorst, R.J., Visser, L.E., Van Der Baan, A.A., Scheffers, W.A., and Van Dijken, J.P. (1988). Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* *54*, 1131–1137.
- Saerens, S., and Swiegers, J.H. (2017). Production of low-alcohol or alcohol-free beer with *Pichia kluyveri* yeast strains (Google Patents).
- Salminen, S., and Von Wright, Atte (ed). (2004). Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (CRC Press).
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F.N., Barrio, E., Querol, A., and Guillamón, J.M. (2011). Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* *28*, 1155–1161.
- Santos, V.C. dos, Bragança, C.R.S., Passos, F.J.V., and Passos, F.M.L. (2013). Kinetics of growth and ethanol formation from a mix of glucose/xylose substrate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. *Antonie Van Leeuwenhoek* *103*, 153–161.
- Santoyo, M.C. (2001). Contribution à l'étude physiologique d'une nouvelle souche de bactérie lactique amylolytique hétérofermentaire en relation avec la production d' α -amylase. Thèse de doctorat Université Montpellier 2.
- Sawatari, Y., and Yokota, A. (2007). Diversity and mechanisms of alkali tolerance in *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 3909–3915.
- Scanes, K.T., Hohmann, S., and Prior, B.A. (1998). Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *South Afr. J. Enol. Vitic.* *19*, 17–24.
- Schwann, T. (1837). Vorläufige Mittheilung, betreffend Versuche über die Weingährung und Faulniss. *Ann Phys Chem* *41*, 184–193.
- Segovia Bravo, K.A., Arroyo López, F.N., García García, P., Durán Quintana, M.C., and Garrido Fernández, A. (2007). Treatment of green table olive solutions with ozone. Effect on their polyphenol content and on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth. *Int. J. Food Microbiol.* *114*, 60–68.

Références bibliographiques

- Seïdou, N.B., Kayodé, A.P.P., Vieira-Dalode, G., Baba-Moussa, L., Kotchoni, S.O., and Hounhouigan, D.J. (2011). Improvement of the traditional technology for the production of gowé a sour and sweet beverage from Benin. *Afr. J. Food Sci.* 5, 806–813.
- Seigner, C., Prodanov, V., and Marchis-Mouren, G. (1985). On porcine pancreatic α -amylase action: kinetic evidence for the binding of two maltooligosaccharide molecules (maltose, maltotriose and o-nitrophenylmaltoside) by inhibition studies. *Eur. J. Biochem.* 148, 161–168.
- Sharma, A., and Satyanarayana, T. (2013). Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochem.* 48, 201–211.
- Sharma, V., and Mishra, H.N. (2014). Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetable juices. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 1123–1128.
- Siewewerts, S., de Bok, F.A.M., Hugenholtz, J., and van Hylckama Vlieg, J.E.T. (2008). Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4997–5007.
- Smid, E.J., and Lacroix, C. (2013). Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 148–154.
- Smit, G., Smit, B., and Engels, W. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 591–610.
- Song, H., Jang, S.H., Park, J.M., and Lee, S.Y. (2008). Modeling of batch fermentation kinetics for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Biochem. Eng. J.* 40, 107–115.
- Steinkraus, K.H. (1997). Fermented food safety classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control* 8, 311–317.
- Svanberg, U., Sjögren, E., and Lorri, W. (1992). Inhibited growth of common enteropathogenic bacteria in lactic-fermented cereal gruels. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 601–606.
- Swinnen, I., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H., and Van Impe, J.F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 137–159.
- Szczodrak, J., and Targoński, Z. (1988). Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 300–303.
- Tai, S.L., Daran-Lapujade, P., Walsh, M.C., Pronk, J.T., and Daran, J.-M. (2007). Acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature: a chemostat-based transcriptome analysis. *Mol. Biol. Cell* 18, 5100–5112.
- Taillandier, P., Portugal, F.R., Fuster, A., and Strehaiano, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiol.* 24, 95–100.

Références bibliographiques

- Tamang, J.P., and Kailasapathy, K. (2010). Fermented foods and beverages of the world (Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis).
- Thomas, D.S., Hossack, J.A., and Rose, A.H. (1978). Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* *117*, 239–245.
- Thomas, K.C., Hynes, S.H., and Ingledew, W.M. (2002). Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 1616–1623.
- Thompson, J., and Gentry-Weeks, C.R. (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. in *Bactéries Lactiques*. ed Lorica Uriage France. 239–290.
- Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., and Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* *80*, 47–53.
- Traoré, T., Mouquet, C., Icard-Vernière, C., Traoré, A., and Trèche, S. (2004). Changes in nutrient composition, phytate and cyanide contents and α -amylase activity during cereal malting in small production units in Ouagadougou (Burkina Faso). *Food Chem.* *88*, 105–114.
- Troller, J.A., and Stinson, J.V. (1981). Moisture requirements for growth and metabolite production by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* *42*, 682–687.
- Van Impe, J., Poschet, F., Geeraerd, A., and Vereecken, K. (2005). Towards a novel class of predictive microbial growth models. *Int. J. Food Microbiol.* *100*, 97–105.
- Varela, C. (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *100*, 9861–9874.
- Verhulst, P.-F. (1838). Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Correspondance mathématique et physique* publiée par A. Quetelet *10*, 113–121.
- Vieira-Dalodé, G., Jespersen, L., Hounhouigan, J., Moller, P.L., Nago, C.M., and Jakobsen, M. (2007). Lactic acid bacteria and yeasts associated with gowé production from sorghum in Bénin. *J. Appl. Microbiol.* *103*, 342–349.
- Vieira-Dalodé, G., Madodé, Y.E., Hounhouigan, J., Jespersen, L., and Jakobsen, M. (2008). Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts as inoculum enrichment for the production of gowé, a sour beverage from Benin. *Afr. J. Microbiol. Res.* *2*, 179–186.
- Viljoen, B.C. (2006). Yeast ecological interactions. Yeast–yeast, yeast–bacteria, yeast–fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. In *Yeasts in Food and Beverages*, (Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag), pp. 83–110.
- Wales, D.S., Cartledge, T.G., and Lloyd, D. (1980). Effects of glucose repression and anaerobiosis on the activities and subcellular distribution of tricarboxylic acid cycle and associated enzymes in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Microbiology* *116*, 93–98.
- Walker, G.M. (1998). *Yeast physiology and biotechnology* (John Wiley & Sons).

Références bibliographiques

- Warren, F.J., Butterworth, P.J., and Ellis, P.R. (2012). Studies of the effect of maltose on the direct binding of porcine pancreatic α -amylase to maize starch. *Carbohydr. Res.* 358, 67–71.
- Watier, D., Dubourguier, H.C., Leguerinel, I., and Hornez, J.P. (1996). Response surface models to describe the effects of temperature, pH, and ethanol concentration on growth kinetics and fermentation end products of *a Pectinatus sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1233–1237.
- Weusthuis, R.A., Visser, W., Pronk, J.T., Scheffers, W.A., and Van Dijken, J.P. (1994). Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. *Microbiology* 140, 703–715.
- White, C. (2012). Yeast nutrients make fermentations better. Whitelab Pure Brew. Yeast Accessed 10.
- Xie, F., Quan, S., Liu, D., Ma, H., Li, F., Zhou, F., and Chen, G. (2014). Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylothrophicus* strain P11-2. *Process Biochem.* 49, 47–53.
- Yao, A.A., Egounlety, M., Kouame, L.P., and Thonart, P. (2009). Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylicés et fermentés de l’Afrique de l’Ouest: leur utilisation actuelle. *Ann. Médecine Vét.* 153, 54–65.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., and Van’t Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.
- Zwietering, M.H., Wiltzes, T., De Wit, J.C., and Riet, K.V. (1992). A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *J. Food Prot.* 55, 973–979.
- Zwietering, M.H., Wiltzes, T., Rombouts, F.M., and Van’t Riet, K. (1993). A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods. *J. Ind. Microbiol.* 12, 324–329.

Resumo da tese

O objetivo geral deste trabalho é de propor um modelo global de fermentação do gowé, uma bebida tradicional fermentada feita à base de uma mistura de farinha de sorgo maltado e não maltado consumido no Benim. Tradicionalmente, durante a produção realizada em pequena escala, a fase de fermentação é conduzida por cepas de bactérias lácticas e leveduras selvagens. O domínio da fase de fermentação mista condiciona a obtenção de um gowé detentor de qualidades apreciadas pelos consumidores. Neste foi implementada a estratégia de modelagem modular. Inicialmente, foi modelado o crescimento e a produção de ácido láctico de duas linhagens comerciais de bactérias lácticas (*Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus plantarum*), tendo em conta os efeitos da temperatura, pH e da concentração do ácido láctico sobre o crescimento destes microrganismos. O modelo de crescimento de estirpes de bactérias lácticas enriqueceu-se de um modelo capaz de prever o valor de pH durante a fermentação do gowé baseado na produção de ácido láctico. A segunda fase foi a modelagem do impacto da fermentação láctica, da temperatura, dos níveis de açúcares obtidos a partir da farinha de malte e da temperatura de cozedura sobre a atividade das amilases do malte. A agregação dos modelos de sacarificação e fermentação láctica foi validada em dados experimentais obtidos durante a produção do gowé em escala laboratorial. Temperaturas de fermentação e cozedura aparecem como sendo alavancas para controlar os níveis de produção de ácido láctico e de açúcares no gowé. O crescimento de uma estirpe comercial da espécie *Pichia kluyveri* foi modelado de acordo com a mesma estratégia que foi utilizada para as cepas de bactérias lácticas. A inibição do crescimento das estirpes de bactérias lácticas pelo etanol produzido pela levedura e a inibição do crescimento da cepa de levedura por ácido láctico foram modeladas. O modelo geral foi desenvolvido pela integração dos diversos modelos acima mencionados usando software Simulink (Matlab). O resultado da fermentação do gowé em escala laboratorial, inoculado com a cepa de *Lactobacillus plantarum* e *Pichia kluyveri* não pôe em causa a qualidade do modelo global que aparece como uma ferramenta de tomada de decisão para escolha de microrganismos starters assim como os parâmetros de fermentação. Os resultados das fermentações de validação do modelo global, sugerem o desenvolvimento de uma microflora selvagem presente no sorgo que estava interferindo com as estirpes seleccionadas. As diferenças entre os dados experimentais e dados previstos poderiam ser evidência de interações entre a cepa de bactérias láctica e leveduras não tidos em conta pelo modelo global. Simulações realizadas, mostraram que, com o uso de starters, o tempo das fermentações realizadas a 40 ° C poderia ser reduzido para 15 horas, isto é, produzindo um gowé que apresente boas características sanitárias e sensoriais.

Palavras-chave: Fermentação mista, Sacarificação, Modelagem matemática, Bactérias lácticas, Leveduras, Sorgo, Malte, Gowé.

Résumé de la thèse

L'objectif général de ce travail est de proposer un modèle global de la fermentation du gowé, une boisson traditionnelle fermentée à base d'un mélange de farine de sorgho malté et non malté consommée au Bénin. Traditionnellement, lors de la fabrication réalisée à petite échelle, l'étape de fermentation est conduite par des souches de bactéries lactiques et de levures sauvages. La maîtrise de l'étape de fermentation mixte conditionne l'obtention de gowé de qualité appréciée par les consommateurs. La stratégie de modélisation mise en œuvre est modulaire. Dans un premier temps, la modélisation de la croissance et de la production d'acide lactique de deux souches commerciales de bactéries lactiques (*Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum*) a été réalisée, prenant en compte l'effet de la température, du pH, de la concentration en acide lactique. Le modèle de croissance des deux souches lactiques a été enrichi d'un modèle capable de prédire la valeur du pH lors de la fermentation du gowé en fonction de la production d'acide lactique. La seconde étape a été la modélisation de l'impact de la fermentation lactique, de la température, des teneurs en sucres, de la température de cuisson de la farine de malt, sur l'activité amylasique du malt. Le modèle agrégeant celui de la fermentation lactique et celui de la saccharification a été validé sur les données expérimentales recueillies lors de fabrication de gowé à l'échelle du laboratoire. La température de précuisson et de la fermentation apparaissent comme des leviers pour contrôler les teneurs en acide et en sucre du gowé. La croissance d'une souche commerciale de l'espèce *Pichia kluyveri* a été modélisée selon la même stratégie que celle utilisée pour les souches lactiques. L'inhibition de la croissance des souches lactiques par l'éthanol produit par la souche de levure et l'inhibition de la croissance de la souche de levure par l'acide lactique ont été modélisées. Le modèle global a été élaboré en intégrant les différents modèles précités en utilisant le logiciel Simulink (Matlab). Les résultats de fermentation de gowé, à l'échelle du laboratoire, inoculées avec la souche de *Lactobacillus plantarum* et celle de *Pichia kluyveri* ne remettent pas en cause la qualité du modèle global qui apparait comme un outil d'aide à la décision pour le choix des starters et des paramètres de conduite de la fermentation. Les résultats de ces fermentations de validation suggèrent le développement d'une microflore sauvage présente dans le sorgho qui interférerait avec celui des souches sélectionnées. Les écarts observés entre les données expérimentales et les données prédites pourraient être la preuve d'interactions entre la souche lactique et celle de la levure non prises en compte par le modèle global. Des simulations ont montré qu'avec les starters utilisés, le temps de fermentations réalisées à 40°C pouvait être réduit à 15 heures, tout en produisant un gowé présentant de bonnes caractéristiques sanitaires et sensorielles.

Mots-clés : Fermentation mixte, Saccharification, Modélisation mathématique, Bactéries lactiques, levures, Sorgho, Maltage, Gowé.

Abstract :

The general objective of this work is to propose a global model of the fermentation of gowé, a traditional fermented drink made based on mixture of malted sorghum flour consumed in Benin. Traditionally, during small-scale production, the fermentation step is carried out by strains of lactic acid bacteria and wild yeasts. The control of mixed fermentation conditions production of gowé of quality appreciated by the consumers. The modelling strategy implemented is modular. In a first step, the modelling of lactic acid growth and production of two commercial strains of lactic bacteria (*Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*) was carried out, taking into account the effect of temperature, pH, and the concentration of lactic acid. The growth model of the two lactic strains was enriched with a model capable of predicting the pH value during gowé fermentation as a function of lactic acid production. The second step was the modelling of the impact of lactic fermentation, temperature, sugars content, cooking temperature of malt flour, on the amylase activity of malt. The model aggregating the lactic fermentation and the saccharification model was validated on the experimental data collected during the manufacture of gowé at the laboratory scale. The precooking and fermentation temperatures appear as levers to control the acid and sugar contents of the gowé. The growth of a commercial strain of the species *Pichia kluyveri* was modelled according to the same strategy as that used for the lactic strains. The inhibition of the growth of the lactic strains by the ethanol produced by the yeast strain and the inhibition of the growth of the yeast strain by lactic acid were modelled. The global model was developed by integrating the aforementioned models using Simulink software (Matlab). Laboratory-scale gowé fermentation results inoculated with the *Lactobacillus plantarum* strain and the *Pichia kluyveri* strain do not question the quality of the overall model as a decision support tool for choice starters and driving parameters of the fermentation. The results of these validation fermentations suggest the development of a wild microflora present in sorghum that interfered with that of the selected strains. The differences observed between the experimental data and the predicted data could be evidence of interactions between the lactic strain and that of the yeast not taken into account by the global model. Simulations have shown that with the starters used, the time of fermentations carried out at 40 ° C. could be reduced to 15 hours, while producing a gowé with good sanitary and sensorial characteristics.

Keywords: Mixed fermentation, Saccharification, Mathematical modelling, Lactic acid bacteria, Yeasts, Sorghum, Malting, Gowé.