

## Valorisation des ressources naturelles comme agent fermentaire d'une bière artisanale

Jacky Michel ANDRIANASOLONANTENAINA<sup>1\*</sup>, Rivo Solotiana RAKOTOMALALA<sup>2</sup>,  
Ermann Tony RANDRIANADY<sup>3</sup>, Jean François RAJAONARISON<sup>1</sup> et Mananjara PAMPHILE<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Ecole Doctorale Génie du Vivant et Modélisation (ED GVM), Université de Mahajanga, Madagascar

<sup>2</sup> Laboratoire microbiologique, Centre Hospitalier Universitaire Professeur Zafisaona Gabriel à Mahajanga

<sup>3</sup> Laboratoire du Groupement des Entreprises pour l'auto-Contrôle des Produits Halieutiques à Mahajanga

<sup>4</sup> Faculté des Sciences, de Technologies et de l'Environnement, Université de Mahajanga, Madagascar

\* Correspondance, courriel : [a.jackymichel@gmail.com](mailto:a.jackymichel@gmail.com)

### Résumé

*Crotalaria ankaizinensis* et *Evodia bilahe* sont parmi des plantes les plus exploitées en tant qu'agents fermentaires durant la production alcoolique artisanale : « *Betsabetsa* ». L'objectif de cette étude est de contribuer à une approche systémique de la production alcoolique artisanale et de décrire les procédés traditionnels de cette fabrication afin de proposer des perspectives pour améliorer les qualités des produits ainsi obtenus. Pour ce faire, des enquêtes ont été effectuées pour collecter des informations concernant les techniques d'utilisation traditionnelle. Les écorces de *E. bilahe* et les racines de *C. ankaizinensis* sont utilisées comme matériels biologiques pour mettre en évidence la présence des levures fermentaires. Les résultats ont montré que, durant cette production alcoolique artisanale, la bonne pratique d'hygiène et la bonne pratique de fabrication ne sont pas respectées d'une manière certaine. Les études microbiologiques effectuées ont montré que ces plantes renferment des levures fermentaires. L'étude approfondie des levures ainsi isolées à partir de ces ressources naturelles et la mise au point de cette technologie artisanale pourraient être un des moyens pour améliorer la qualité hygiénique de ces produits.

**Mots-clés :** *ressources naturelles, levures, fermentation, Betsabetsa, qualité.*

### Abstract

#### Valorization of the natural resources like agent fermentaire of an artisanal beer

*Crotalaria ankaizinensis* and *Evodia bilahe* are among plants the most exploited as agents fermentaire during the alcoholic artisanal production : "Betsabetsa". The objective of this study is to contribute to a systemic approach of the artisanal alcoholic production and to describe the traditional processes of this manufacture in order to propose prospects to improve qualities of the products thus obtained. With this intention, investigations were carried out to collect information concerning the techniques of traditional use. The barks of *E. bilahe* and the roots of *C. ankaizinensis* are used like biological materials to highlight the presence of the yeast fermentaire. The results showed that, during this artisanal alcoholic production, the good practice of hygiene and good manufacturing practice are not respected in an unquestionable way. The

microbiological studies showed that these plants contain yeasts fermentaire. The thorough study of yeasts thus insulated starting from these natural resources and the development from this artisanal technology could be one of the means to improve hygienic quality of these products.

**Keywords :** *natural resources, yeasts, fermentation, Betsabetsa, quality.*

## 1. Introduction

La technologie de la préparation d'alcool artisanal est presque identique, seuls les ferments utilisés sont différents [1 - 3]. A Madagascar, surtout dans la partie Centre Nord-Est, *Evodia bilahe* [4] et *Crotalaria ankaizinensis* [5] sont des plantes les plus utilisées dans la production de boisson alcoolique artisanale : « *Betsabetsa* ». Traditionnellement, les producteurs les utilisent (écorces cas de *E. bilahe* et racines cas de *C. ankaizinensis*) pour la préparation de cette boisson. Des approches paysannes sur cette production artisanale ne sont pas encore effectuées du point de vue technologique, qualité microbiologique et propriétés chimiques. Pour se faire, cette étude est basée sur la description de la technologie artisanale de la production de « *Betsabetsa* » et la mise en évidence de la présence des levures fermentaires que renferment ces plantes.

## 2. Matériel et méthodes

### 2-1. Matériel biologique

Les racines de *C. ankaizinensis* (**Figure 1**) et les écorces de *Evodia bilahe* (**Figure 2**) sont utilisées en tant que source des levures fermentaires du jus de canne. Ainsi, on a collecté ces organes suivant les normes appropriées durant cette étude afin d'étudier leur pouvoir fermentaire. Ces échantillons représentant la population étudiée sont utilisés en tant que matériel biologique.



**Figure 1 :** *Racines de Crotalaria ankaizinensis*



**Figure 2 :** *Ecorces de Evodia bilahe*

On a effectué des enquêtes pour la production des boissons alcoolique artisanale au niveau des populations locales productrices des boissons alcoolisées artisanales utilisant ces matériels biologiques (*C. ankaizinensis* dont le nom vernaculaire « *Bilahy kisotrisotry* » et *E. bilahe* appelé « *Bilahy tagnany* » ou « *Bilahy ririnina* ») ont été effectué. Ainsi, les renseignements pour cette production artisanale ont été collectés, fusionnés et exploités.

## 2-2. Isolements des levures indigènes

Après les enquêtes artisanales effectuées, on a aussi procédé à l'isolement des levures indigènes de ces plantes sur le milieu glucosé synthétique YGC (Yeast Glucose Chloramphénicol) suivant les normes [6 - 8], ainsi des autres études [9, 10]. Les échantillons grattés et pesés (5 g) sont dilués au 5<sup>ème</sup> dans le tryptone sel, soit 125 g (tryptone sel + échantillons) et broyés à l'aide d'un broyeur pendant 2 mn. Le broyat (suspension mère) est ensuite laissé reposer pendant 24 h pour la régénération des microorganismes présents. Ensuite, 1 ml de cette solution a été utilisé pour l'ensemencement à 25 °C d'incubation pendant 72 heures [11].

## 2-3. Test du pouvoir fermentaire des souches blanches isolées

Cette méthode consiste à tester le pouvoir fermentaire des souches blanches isolées [12, 13]. Dans ce cas, le milieu glucosé naturel (siramamy gasy dilué à 20 %) ont été utilisés. Les souches sont introduites et étalées doucement sur la paroi interne des flacons à l'aide d'une anse stérile et à chaque prise d'une autre souche il faut stériliser l'anse. Ensuite la préparation a été incubée à 25°C pendant 120 h dont les flacons ne sont fermés complètement [4].

## 3. Résultats

### 3-1. Résultats d'enquête pour la production de « *Betsabetsa* »

Les résultats d'enquête montrent que la fabrication des boissons alcooliques artisanales se déroule en trois étapes fondamentaux. La première étape est la préparation constitue l'épluchage (*Figure 3a*) et le découpage (*Figure 3b*) de la canne à sucre. Ensuite, on procède au pressage de la canne à sucre (à petite échelle : « *Famiam-pary* » ; à grande échelle : « *Fangarignagna* ») afin de récupérer le jus comme substrat durant la fermentation alcoolique (*Figure 4*).



**Figure 3 :** *Epluchage (a) et découpage de la canne à sucre (b)*



**Figure 4 :** Pressage de la canne à sucre à petite échelle (a) et à grande échelle (b)

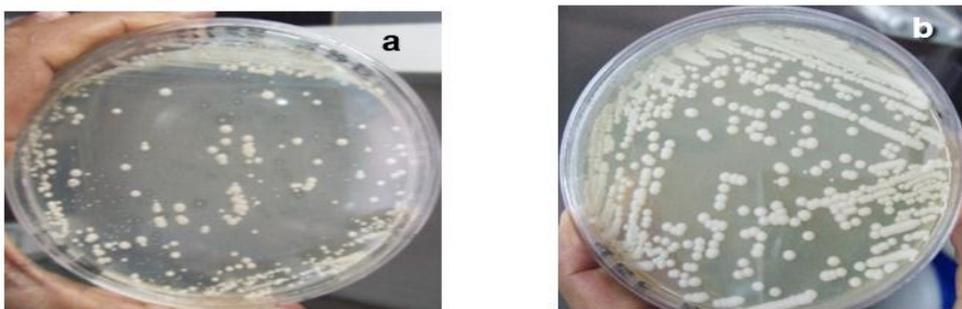
Puis, les racines (cas de *C. ankaizinensis*) ou les écorces (cas de *E. bilahe*) sont utilisées et recyclées 2 à 3 fois en tant que ferment, soit environ 500 g pour 20 litres de jus de canne (**Figure 5a**). La température d'incubation est variée de 30 à 35 °C pendant 8 à 14 jours (**Figure 5b**) en fonction des facteurs intrinsèques et extrinsèques qui influent cette production alcoolique (Température, Concentration en substrat, etc.). Après la fermentation, le jus de canne limpide devient jaune (**Figure 5c**). Concernant le goût, plus la durée d'incubation augmente, plus le goût sucré disparaît. Ainsi, la boisson alcoolique prête pour la consommation est témoinnée par le goût d'amertume.



**Figure 5 :** Préparation du jus de canne et mode d'incubation incubation

### 3-2. Résultats d'isolement des levures blanches fermentaires isolées

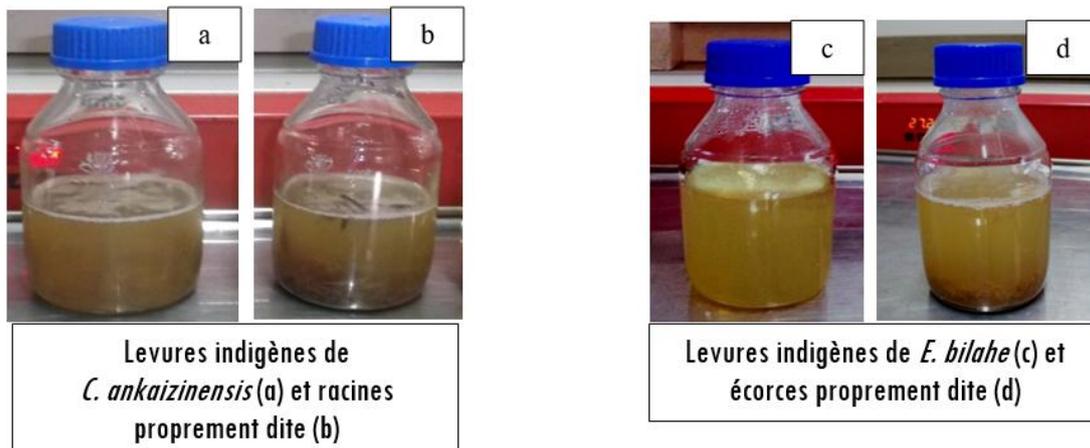
Après la lecture sur le dénombrement par méthodes de routine des levures (**Figure 6**) [6 - 8], on a isolée la souche de levures blanches, lisses et bombée de diamètre environ 1 à 2,5 mm responsable de la fermentation sur le milieu YGC solide.



**Figure 6 :** Souches blanches isolées à partir de *C. ankaizinensis* (a) et *E. bilahe* (b)

### 3-3. Études du pouvoir fermentaire des levures blanches isolées

Pour cette étude comparative, on a incubé simultanément à 25 °C pendant 5 jours le « *siramamy gasy* » stérile (produit issu de la cristallisation du jus de canne) inoculé des souches extraites de ces plantes : racines pour *C. ankaizinensis* et écorce pour *E. bilahe* afin d'étudier le pouvoir fermentaire des souches ainsi isolées [4, 5, 11]. La **Figure 7** représente le test du pouvoir fermentaire de ces plantes et leurs souches blanches isolées dans ce milieu glucosé naturel.



**Figure 7 :** Test pouvoir fermentaire des racines (Cas de *C. ankaizinensis*) et écorces (Cas de *E. bilahe*) et leurs levures indigènes

Cette photo montre que, dans le milieu sucré naturel (*siramamy gasy*), les souches blanches extraites de *C. ankaizinensis* et les racines brutes de *C. ankaizinensis* (**Figure 7**) provoquent des formations des bulles à la surface du flacon. Cela prouve qu'il y a une fermentation alcoolique dans ces flacons et on peut donc utiliser seulement ces levures indigènes durant cette production alcoolique artisanale sans l'abattage abusif de ces plantes [4, 5, 11].

## 4. Discussion

Lors de la production de boisson alcoolique artisanale « *Betsabetsa* », la Bonne Pratique d'Hygiène et de la Bonne Pratique de Fabrication sont négligés. De plus, l'exploitation abusive de ces racines *in situ* en tant que ferment a des impacts négatifs sur la biodiversité végétale (abattage abusif des plantes durant l'utilisation de ces ressources naturelles). Après l'étude des propriétés biochimiques et physiologiques de ces plantes sur le milieu YGC solide, on a constaté que ces plantes renferment des levures et des moisissures [4, 5]. Des études récentes ont aussi caractérisé les levures indigènes de ces écorces [4] et ces racines [5] dont la majorité des levures isolées sont forte probablement de *Saccharomyces sp* [4, 5]. Durant cette étude, on a constaté que cette fermentation alcoolique était justifiée par la présence des bulles à la surface des flacons contenant du milieu glucosé naturel stérile [1]. Ce qui justifie que les souches ainsi isolées et inoculées sont fermentaires. Durant cette métabolisme anaérobie, il y a la production d'éthanol et de CO<sub>2</sub> par ces levures [14 - 16]. L'étude effectuée par Sieblist et al. (2011) vérifie ce raisonnement et montre que la désorption du CO<sub>2</sub> est étroitement liée au temps de séjour des bulles dans le réacteur [17]. Lorsque la concentration intracellulaire en CO<sub>2</sub> est élevée, il semble que la nucléation de bulles de CO<sub>2</sub> pur

puisse se produire au sein de la phase biomasse [18, 19]. Pour se faire, d'autres études seront de plus en plus intéressantes pour améliorer la qualité des produits artisanaux, industriels, etc. utilisant les levures indigènes [11, 20]. Outre, l'exploitation de cette technique pourrait être un de moyen pour conserver ces biodiversités. Autrement dit, il suffit de reproduire ces levures indigènes et de les utiliser sans l'abattage des plantes à chaque fois.

## 5. Conclusion

Pour conclure, durant cette production artisanale, les qualités hygiénique et microbiologique de ces produits ne sont pas assurées. D'après les tests microbiologiques effectués, ces plantes renferment des levures indigènes fermentaires et peuvent être utilisées pour produire de l'alcool plus hygiénique. Outre, à la suite de l'identification de ces levures présentes dans ces levures endogènes, une au point de la technologie de la production artisanale sera étudiée et par la suite proposée au producteur pour éviter la contamination par les souches pathogènes de produits. De plus, la conservation de cette plante *in situ*, sera proposée pour une possibilité de la valorisation pharmacologique.

## Références

- [1] - B. BOTTON, « *La physiologie des levures. Ds : Larpent J.P., Biotechnologie des levures* ». Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris, (1991) 12 - 127
- [2] - P. SIGSGAARD, « *Sélection de nouvelles levures de bière, cerevisiae and biotechnology* ». Belgique, (1994) 22 - 50
- [3] - N. P. JOLLY et I. S. PRETORIUS, " *The distribution of non-Saccharomyces cerevisiae yeast strains in four wine production regions of the western cape, South Africa*". Tenth International Symposium on Yeasts, 302 (2000)
- [4] - M. PAMPHILE, H. L. TSIRINIRINDRAVO, M. RAHERIMANDIMBY et A. RANDRIANIERENANA, « *Etude des levures endogènes de Evodia bilahe, rutacée endémique de Madagascar* ». *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, ISSN (2016) 1991 - 8631
- [5] - M. PAMPHILE, J. M. ANDRIANASOLONANTENAINA et E. T. RANDRIANADY, « *Caractérisation des levures isolées à partir de Crotalaria ankaizinensis, plante endémique de Madagascar utilisée dans la production alcoolique artisanale : Betsabetsa* ». *Revue Afrique Science* ISSN 1813-548X, 12 (6) (2016) 178 - 199
- [6] - NF EN ISO 7954, « *Dénombrement de levure et moisissure, Technique par comptage des colonies à 25 °C* », (Août 1988)
- [7] - NF EN ISO 7118, « *Microbiologie générale, Directive pour les examens microbiologiques* »
- [8] - XP V08-059, « *Relative au dénombrement et isolement des levures et des moisissures par comptage des colonies à 25 °C* », (Novembre 1995)
- [9] - G. M. HEARD et G. H. FLEET, " *Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation*". *J. Appl. Bacteriol*, 60 (1986) 477 - 481
- [10] - A. MARTINI, M. CIANI et G. SCORZETTI, " *Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces*". *Am. J. Enol. Vitic.*, 47 (1996) 435 - 440
- [11] - M. PAMPHILE, H. H. RANDRIANANTOANDRO, H. L. TSIRINIRINDRAVO, « *Bière artisanale à partir de levures indigènes de Evodia bilahe* ». Editions Universitaires Européennes. Allemagne. ISBN 978-3-639-54327-8, (2016)

- [12] - J. P. LARPENT, « *Biotechnologie des levures* » : Masson, Milan Barcelone Bonn". Paris, (1976) 97 - 127
- [13] - COFALEC, « *Caractérisation des levures de boulangerie* ». Adopté par Comité de Fabrication de levures de panification de l'union européenne. Paris, (2006) 1 - 10
- [14] - C. VERDUYN, E. POSTMA, W. A. SCHEFFERS, J. P. VAN DIJKEN, " *Physiology of Saccharomyces Cerevisiae in Anaerobic Glucose - Limited Chemostat Cultures*". *Journal of General Microbiology*, 136 (1990) 395 - 403
- [15] - J. P. LARPENT, « *Biotechnologie des levures* ». Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris, (1991) 97 - 127
- [16] - Y. S. GONZALEZ, « *Etude de l'adaptation et de la gestion de l'activité cellulaire dans un bioréacteur biétagé : intensification de la production d'éthanol* ». Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, (2008)
- [17] - C. SIEBLIST, O. HÄGEHOLZ, M. AEHLE, M. JENZSCH, M. POHLSCHIEDT, A. LÜBBERT, « *Insights into large-scale cell-culture reactors : II. Gas-phase mixing and CO<sub>2</sub> stripping* ». *Biotechnology journal*, 6 (2011) 1547 - 56
- [18] - C. W. SWART, K. DITHEBE, C. H. POHL, H. C. SWART, E. COETSEE, P. W. J. VAN WYK, J. C. SWARTS, E. J. LODOLO, J. L. F. KOC, " *Gas bubble formation in the cytoplasm of a fermenting yeast*". *FEMS yeast research*, 12 (2012) 867 - 9
- [19] - F. O. ABOKA, W. A. VAN WINDEN, M. M. REGINALD, W. M. VAN GULIK, M. VAN DE BERG, A. OUDSHOORN, J. J. HEIJNEN, " *Identification of informative metabolic responses using a minibioreactor: a small step change in the glucose supply rate creates a large metabolic response in Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast: Chichester, England*, 29 (2012) 95 - 110
- [20] - J. PAGLIARDINI, « *Optimisation du rendement de production de bioéthanol chez Saccharomyces cerevisiae par minimisation de la synthèse du glycérol : approche intégrée de génie métabolique et microbiologique* ». INSA, Toulouse, (2010)